

FORSCHUNGEN
AUF DEM
GEBIET DER PFLANZENKRANKHEITEN

Herausgegeben von

Prof. Dr. Shigeyasu Akai

Universität zu Kyoto

Heft VI, Nr. 2

Kyoto, Japan

1956



Electron microscopic observations on the leaf tissues
of rice plants affected by the blast fungus,
Piricularia Oryzae Cav.

TokuZO HIRAI*, Chiaki MATSUI* and Kosaburo ONO**

Introduction

Surprisingly little has been done, concerning the plant materials, on the ultrathin sectioning coupled with the electron microscopy. However, several attempts have been made to elucidate the fine structure of chloroplasts(4,7,13-15) or to visualize the virus particles within infected cells(2,3,8-10,12).

On the other hand, the mechanism of disease resistance of plants has recently received considerable attention in Japan. KAWAMURA and ONO(6), working on the resistance of Chinese or Indian rice plants to the blast fungus, reported that the cell, into which the fungus began to penetrate, responds hyperergically and thereby stops the generalization of the fungus. Moreover, the cytoplasm within these cells was found to turn brown and become granular. The senior author(5) also pointed out that in the wheat varieties resistant to the snow-blight fungus, *Typhula incarnata*, the cytoplasm in the cells adjacent to the invaded, especially its particulate fraction, tends to exhibit a high activity of certain enzyme system relative to that in the sound cells and consequently borders the infected loci. Thus, it has been generally accepted in Japan that the rate of respiration in plant tissues increases when the host cells are resisting to parasite and these metabolic pathway will be coupled with the effective phosphorylation processes(1,5,11,16).

It is the purpose of the present investigations to supply information, with the aid of electron microscope, upon a locus showing the defence reactions and to clarify the sub-microscopic structures of the rice leaf tissues which resist to the invasion of the blast fungus, one of the most harmful parasites to the rice plants in Japan.

Materials and methods

The upland rice, variety Tamasari, was selected for the test plant resistant to the blast fungus, and the paddy plant, variety Shin No. 4, was also selected for the susceptible one. Both plants were grown in pots under greenhouse conditions and were inoculated with the spore suspension of the causal fungus at their seedling stage. The affected leaf spots were cut in piece about 2 x 7 mm and were fixed in 0.5 per cent solution of osmic acid, then passed through a series of 0.5 per cent formalin and 0.5 per cent chromic acid, successively. After washing in running water for one hour, they were dehydrated and embedded in the usual way in a n-buthylmethacrylate. Ultrathin sections were cut with a steel knife allowing a minimum thickness of 0.02-0.05 μ in a Spencer type ultramicrotome manufactured by the Nippon Microtome Laboratory, Ltd. The sections were floated on a

* Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Nagoya University, Anzjo, Japan.

** Division of Crop Pathology, Hokuriku National Agricultural Experiment Station, Takada, Japan.

Received for publication on 20.h Aug. 1956

Forsch. Gebiet Pflanzenkrankh., Kyoto, 6 (2): 49-59, 1956.

liquid surface of 40 per cent ethyl alcohol and transferred to specimen meshes covered with a thin formvar film. They were examined with an TRS type electron microscope (Akashi Manufacturing Co., Ltd., Japan) without dissolving the methacrylate. The micrographs were taken at magnifications of $\times 2,000$ to $7,000$, further magnification being accomplished photographically.

Observations

1. Normal leaf tissues

The prominent feature observed in the ultrathin sections of normal leaf tissues was that of chloroplasts. In the epidermal cells, on the contrary, no well defined elements were evident, except the cytoplasm which was scarcely recognized locating near the periphery of the cell and consisted of a complicated reticular network structure in appearance. In addition, some of the particulate deposits being of low electron density occupied the central space of the cell, which were assumed presumably to be a vacuolar element (Fig. 3).

The chloroplasts in parenchymatous cells represented the same state of the component as accepted previously^(4,7,13-15), that is, the lamellated grana and osmophilic granules were clearly demonstrated (Figs. 1-2). However, it is to be noted that a number of fine strands protruded, like a branch, from a granum and thus the chloroplast exhibited on the whole a relatively network appearance. Hence, that may be attributable, by any chance, to an artifact due to the unavailable fixation. The cytoplasm in parenchymatous cells could seldom be recognizable, although when it is present, a flat mass lying along cell walls similar to that described above was also identified. The central space in mesophyll cells was studded with the same minute particles as indicated in the epidermal cells, on which frequently the highly dense granules were evident (Fig. 3). Although the nature of these granules remains considerably more obscure, they were of microscopically visible dimensions and have already been referred to as a grape-like granule in Japan⁽¹⁷⁾.

2. Affected leaf tissues of upland rice variety resistant to the blast fungus.

Most characteristic changes in the affected leaf tissues of resistant rice variety were the appearance of a considerable amount of cytoplasmic ground substance (Figs. 4-5). It filled up the cell contents and resembled in structural respect very closely to the normal cytoplasm mentioned above, thus the network structure was predominant. The dense granules, which were observed in the normal tissues, also scattered about the cytoplasmic matrix. Similarly attention must be directed especially to the disintegrated chloroplasts in the affected tissues (Figs. 6-7). The lamellated grana were partially destroyed (Fig. 8), and they lied embedded among the cytoplasmic matrix (Figs. 6-7 and 9). Furthermore, the nuclei exhibiting the varied degrees of degeneration did not show any structural units, but otherwise showed a fairly uniform structure composed of a minute granular element (Figs. 6-7). Nucleoli and chromatin could not be identified.

In the case of resistant variety, it has been well known that the necrotic cell reactions are represented by the fungal invasion. These necrotic cells are indicated in Fig. 10. As being clearly demonstrated, the cell contents became coarsely granular and they were of high electron density. The evidence that the cytoplasmic matrix probably newly synthesized due to infection seems to differentiate to a necrotic element were also provided (Fig. 11).

3. Affected leaf tissues of paddy variety susceptible to the blast fungus.

The affected spots on leaves were cut and examined under an electron microscope. At the parts far from those invaded, the normal chloroplasts and cell components were well preserved (Fig. 3). In the cells near the infection the chloroplasts were entirely disintegrated and a rather frequent fragmentation of them was confirmed (Figs. 12-15). However, the cytoplasmic matrix as has been noted in the resistant cells did not develop. The dense granules were also contained, although not always (Fig. 14).

Discussion

Study of light microscopy has established that the most noticeable effects of fungal invasion on highly resistant tissues are the brown necrosis of tissues together with the disintegration of chloroplasts(6). Despite this, the evidence that these cell reactions can not fully explain the mechanism of host resistance has recently accumulated(5). In the late blight disease of potatoes(16), and as well as in the snow-blight disease of winter cereals(5), one of the most rapid reactions of the resistant cells prior to the appearance of tissue necrosis has been proved to be the rapid rate of protoplasmic streaming or the aggregation of cytoplasm around the infected loci in the cells just beyond the invaded. The possibility that these metabolic energy, namely that of respiration or protoplasmic streamings, should be chiefly concerned with the oxidative phosphorylation processes has been extensively ruled out by the numerous contributions of the Japanese workers(1, 5, 11, 16).

The present electron microscopic observations revealed that there was a marked increase in the apparent amount of cytoplasmic elements in the resistant mesophyll cells due to infection, while no such elements were evident in the susceptible ones except the disintegrated chloroplasts. In the case of unaffected tissues, the cytoplasm was no more than adherent, in a small amount, to cell walls as has been observed in the previous section either in the resistant cells or in the susceptible ones. The increased element showing a structural framework was suggestive, rather than conclusive, of its striking similarity with the cytoplasm. From these facts, that it is originated from the cytoplasmic sources may be permissible.

These findings made in the course of this study would demonstrate that the synthetic metabolism of cytoplasm which may involve the protein and nucleic acid formation, is markedly stimulated in the local site of cell resistance through the phosphorylation processes cited above. Moreover, the phenomenon observed in the interior of necrotic loci will provide the proof of the origin of hypersensitive cell necrosis, by which the fungal hyphae have been assumed to be locked out. The senior author has considered that the hypersensitive cell reactions may be initiated by the function of cytoplasmic nucleoprotein and the original substance responsible for causing necrosis must be the cytoplasm itself(5). It therefore seems likely that the cytoplasmic matrix observed in the electron microscope which will be newly metabolized by the pathway of phosphorylation processes, plays an important role for plant cells in expressing resistance. Whether these cytoplasmic elements represent an anti-fungal action or they interrupt the available nutrients for fungi remains to be clarified in future work.

Résumé

1. For the purpose of extending informations on the mechanism of disease resistance in plants, an observations on the affected leaf tissues of rice variety resistant or susceptible to the blast fungus, *Piricularia Oryzae* CAV., were undertaken by using the electron microscope coupled with the ultrathin sectioning technique.

2. In the resistant variety, a large amount of cytoplasmic ground substance was found to fulfil within the cells near the infection associated with the disintegration of a fine chloroplast structure. In the susceptible variety, only the latter was evident. The normal cytoplasm in unaffected cells was scarcely detectable in amount relative to that in the resistant cells.

3. A convincing explanation to account for these findings, a view that has received strong support from the Japanese workers, was offered referring to the increased phosphorylation processes in the site of defence reactions.

Literature cited

1. AKAZAWA, T. and I. URITANI: Jour. Agr. Chem. Soc. Japan, 29: 331, 1955. (in Japanese with English summary)
2. BLACK, L. M., C. MORGAN and R. W. G. WYCKOFF: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 73: 119, 1950.
3. BRANDES, J.: Naturwiss., 42: 101, 1955.
4. GRANICK, S. and K. R. PORTER: Amer. Jour. Bot., 34: 545, 1947.
5. HIRAI, T.: Forsch. Gebiet PflKrank. Kyoto, 5: 139, 1956. (in English)
6. KAWAMURA, E. and K. ONO: Bull. Imp. Agr. Exp. Station, 4: 13, 1948. (in Japanese)
7. LEYON, H.: Exptl. Cell Research, 4: 372; 6: 497; 7: 288, 1954.
8. —: Exptl. Cell Research, 4: 362, 1953.
9. MATSUI, C.: Virus (Japan), 6: 357, 1956. (in English)
10. NIXON, H. I.: Virology, 2: 126, 1956.
11. SHIMOMURA, T. et al.: Ann. Phytopath. Soc. Japan, 20: 47, 1955. (in Japanese with English summary)
12. SKOTLAND, C. B., D. J. HAGEDORN and M. A. STAHMANN: Phytopathology, 45: 603, 1955.
13. STEINMANN, E.: Exptl. Cell Research, 3: 367, 1952.
14. — and F. S. SJÖSTRAND: Exptl. Cell Research, 8: 15, 1955.
15. THOMAS, J. B., M. BUSTRAAN and C. H. PARIS: Biochim. et Biophys. Acta, 8: 90, 1952.
16. TOMIYAMA, K. et al.: Ann. Phytopath. Soc. Japan, 20: 59, 1955. (in Japanese with English summary)
17. YOSHII, H.: Ann. Phytopath. Soc. Japan, 6: 289, 1937. (in Japanese with English summary)

Explanation of plates

Plate I

Figs. 1-2. Electron micrographs of a chloroplast in the normal leaf tissues of upland rice variety, Tamasari. La: lamellae, Dk: disks, Os: osmiophilic granules. $\times 22,000$

Fig. 3. Micrograph of a cross section through the normal leaf tissues of paddy plant, variety Shin

No. 4. Ep: epidermis, Ch: chloroplasts, Pa: highly dense granules. $\times 12,000$

Plate II

Figs. 4-5. Micrographs of a section through the affected parenchymatous cells of upland rice leaves, variety Tamasari, which is highly resistant to the blast fungus. Ch: chloroplasts, Pa: dense granules, Cm: cytoplasmic matrix. $\times 8,000$

Figs. 6-7. Micrographs of a section through the affected parenchymatous cells of upland rice leaves. Nu: nucleus, DCh: degenerated chloroplasts, Cm: cytoplasmic matrix showing a network structure, on which some dense units are evident (arrows). $\times 17,000$

Plate III

Fig. 8. Micrograph showing a chloroplast in the affected leaf cells of upland rice variety, Tamasari. La: lamellae, Dk: disks, Os: osmiophilic granules, Cm: cytoplasmic matrix, $\times 29,000$

Fig. 9. Micrograph of the affected leaf cells of upland rice variety, Tamasari, showing the partially degenerated chloroplasts (Ch) and a cytoplasmic matrix (Cm), the latter lies embedded between the two chloroplasts. La: lamellae. $\times 29,000$

Plate IV

Fig. 10. Necrotic brown reaction (B and arrows) showed by the protoplasmic network structure (Pr) in the resistant upland rice variety, Tamasari, due to the infection of the blast fungus. DCh: degenerated chloroplasts. $\times 28,000$

Fig. 11. The internal structure of the necrotic cells in the resistant upland rice variety, Tamasari, which has responded hyperergically to the invasion of the blast fungus. $\times 8,000$

Plate V

Fig. 12. Electron micrograph of a thin section showing a epidermal leaf cell of the susceptible paddy plants, variety Shin No. 4. Ep: epidermis, DCy: degenerated cytoplasm. $\times 10,000$

Fig. 13. Electron micrograph of a thin section showing the leaf parenchymatous cells of the susceptible paddy plants, variety Shin No. 4. DCh: degenerated chloroplasts. $\times 9,000$

Figs. 14-15. The same parts as shown in Figure 13. DCh: degenerated chloroplasts, Pa: dense granules. $\times 12,000$

Bar 1 μ .

Plate I

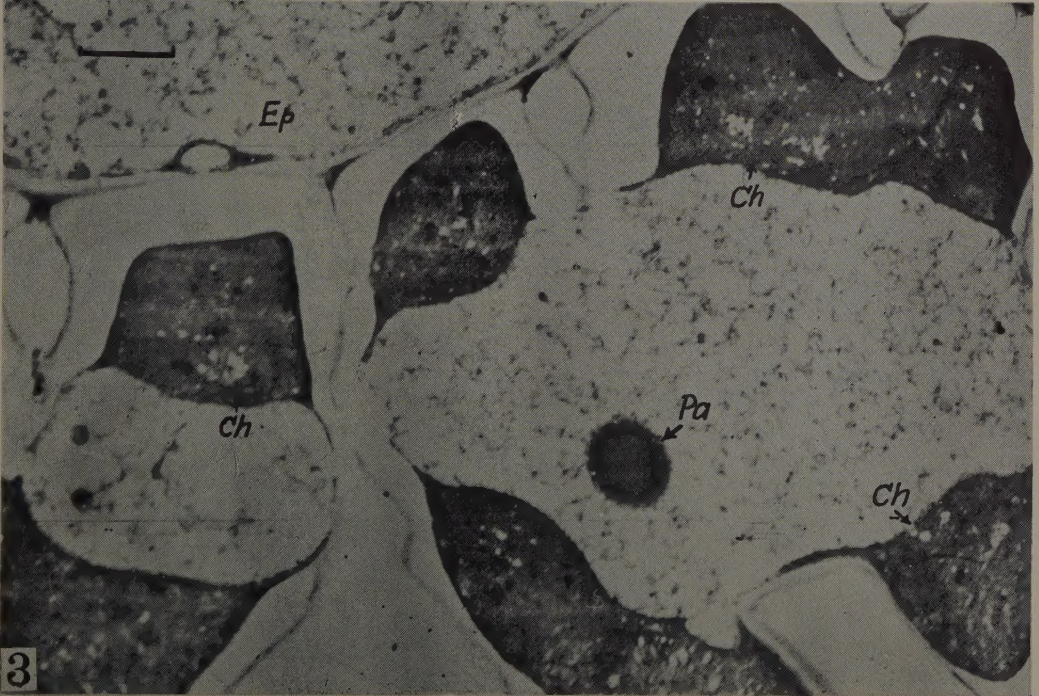
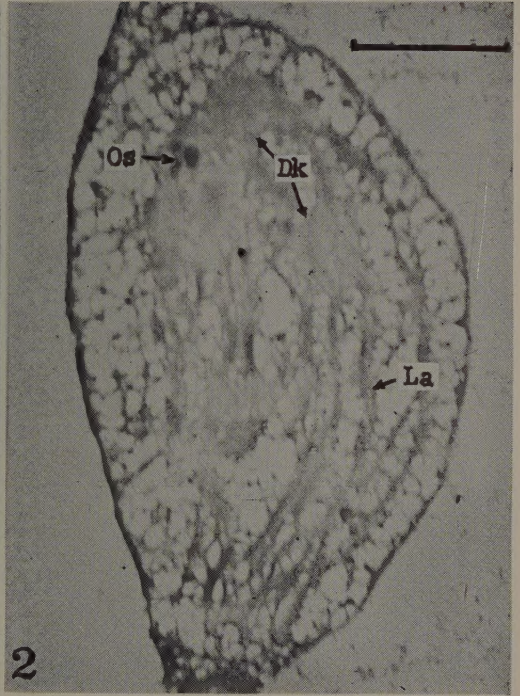
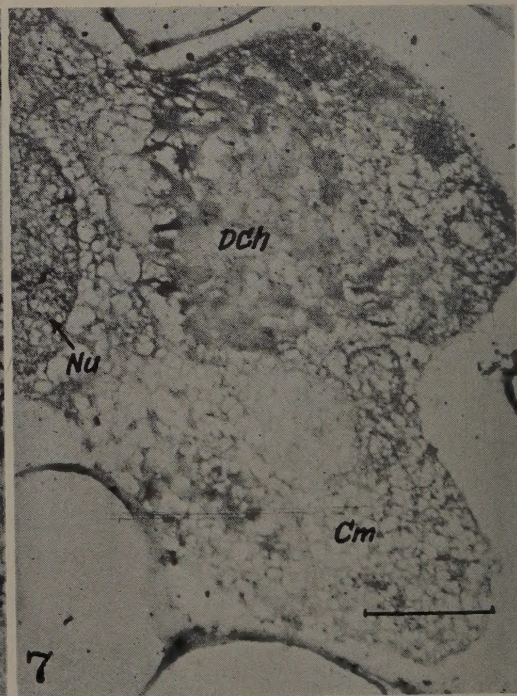
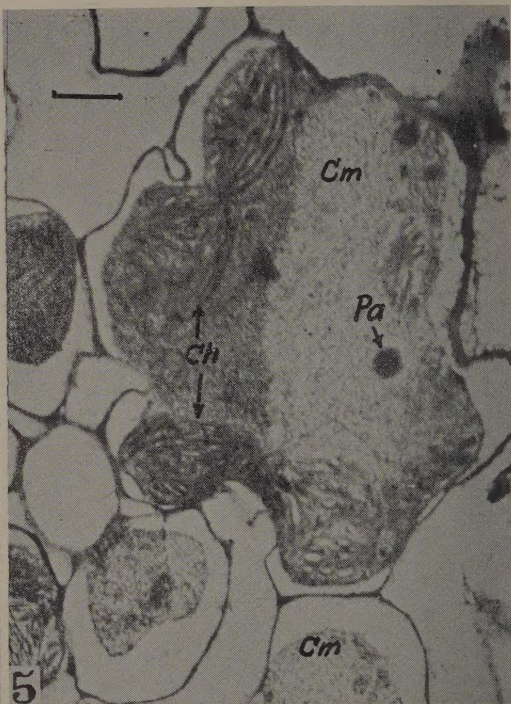
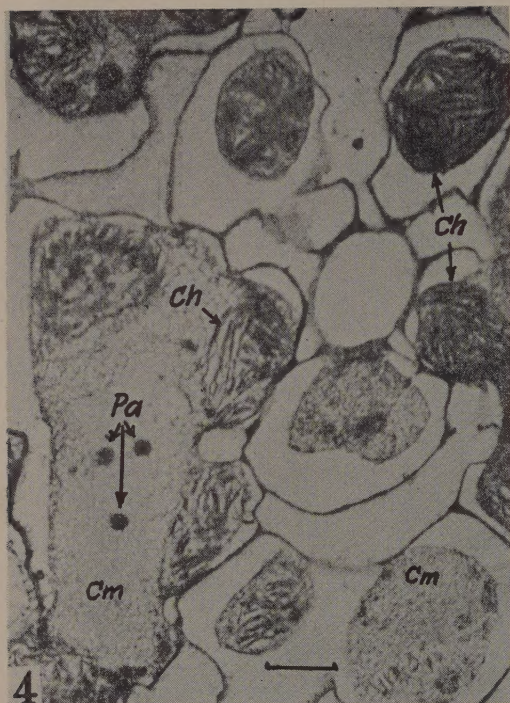


Plate II



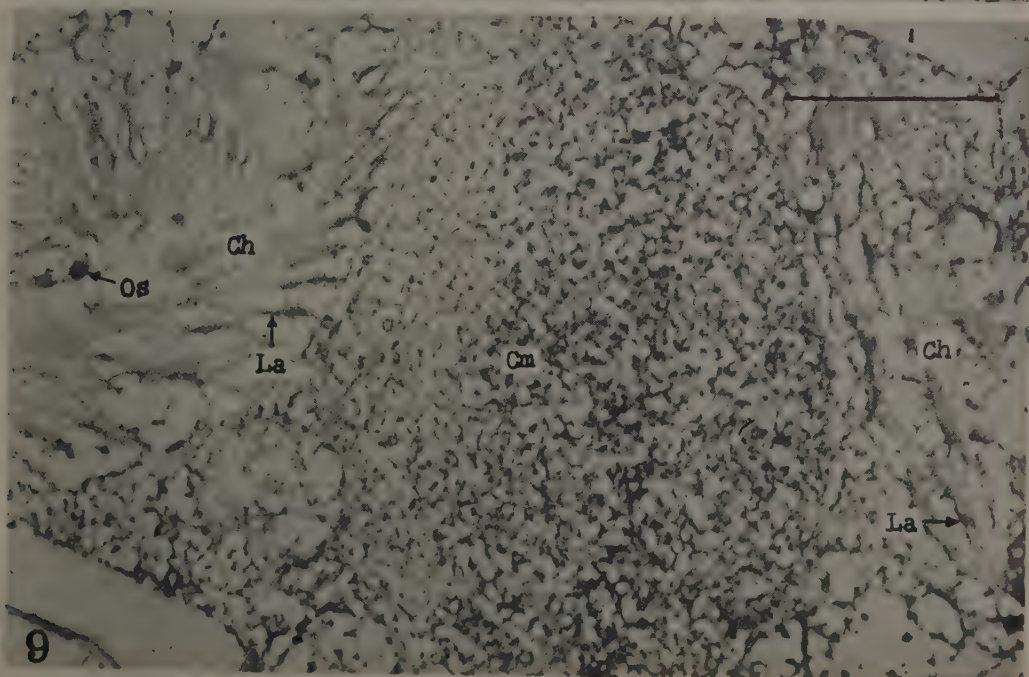
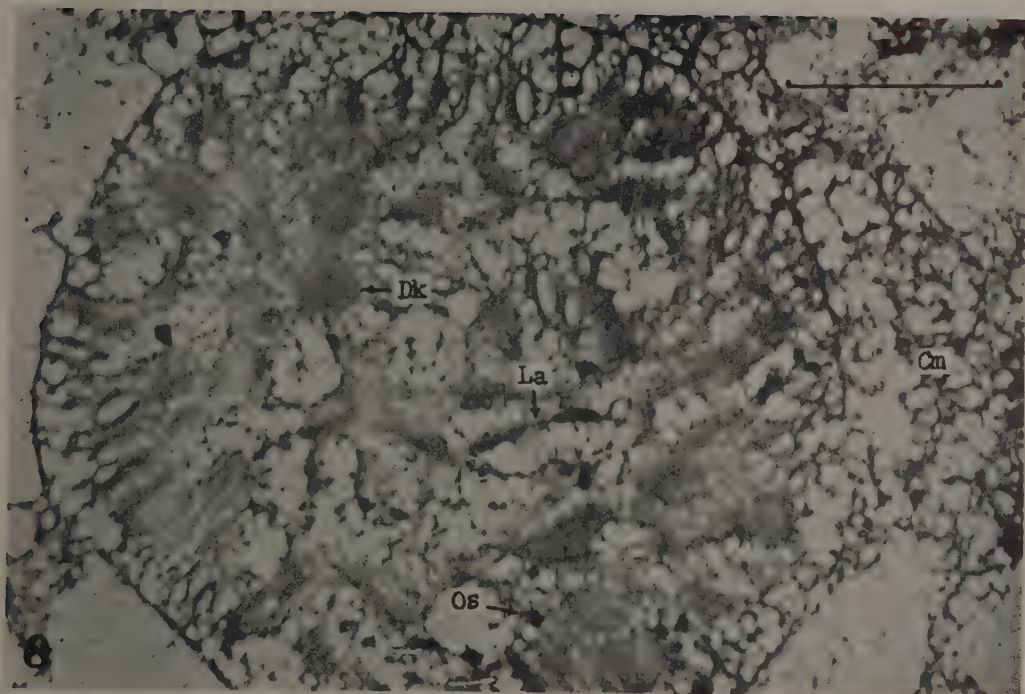


Plate IV

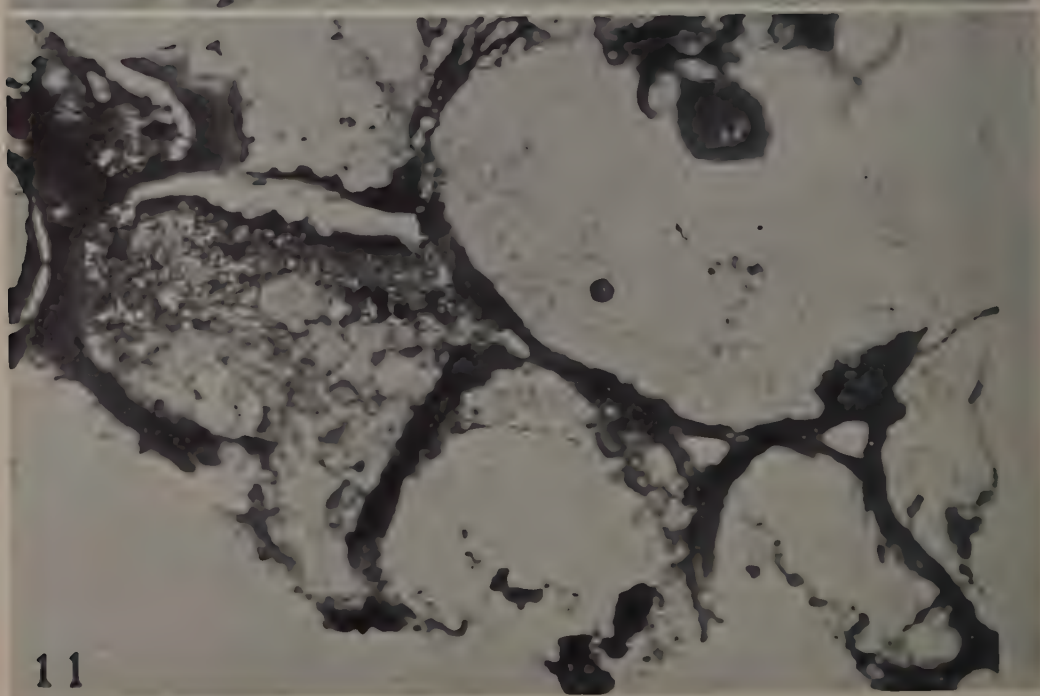
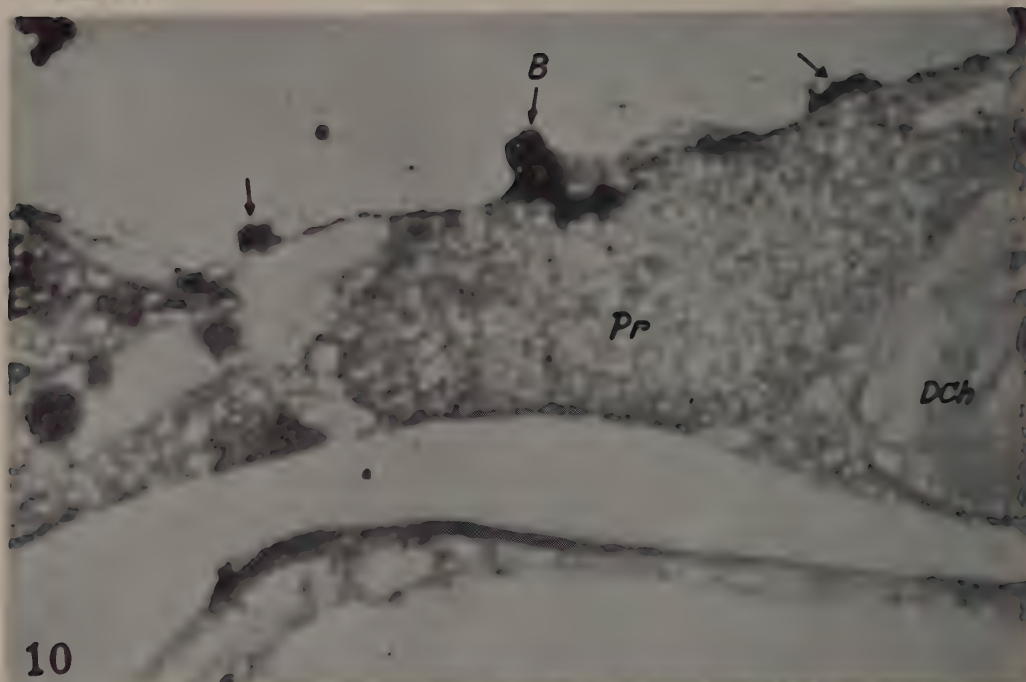
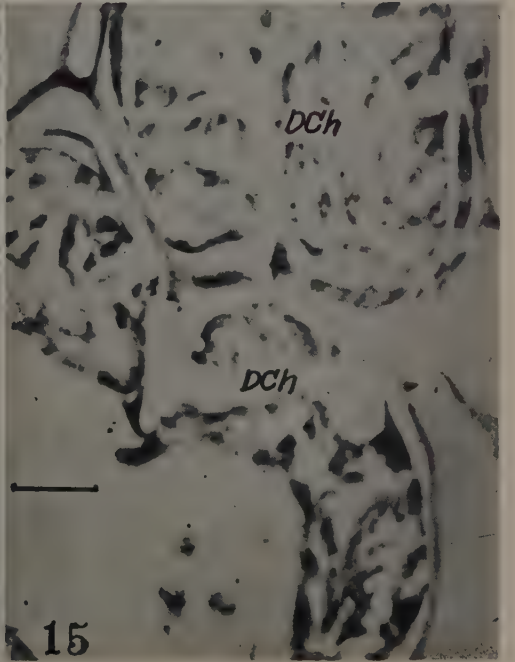
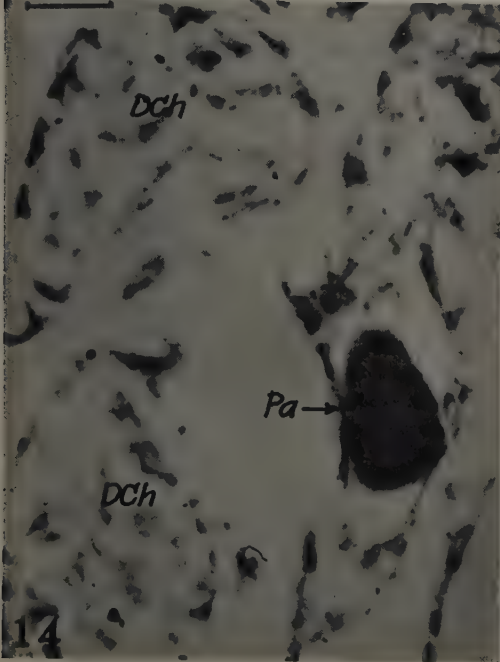
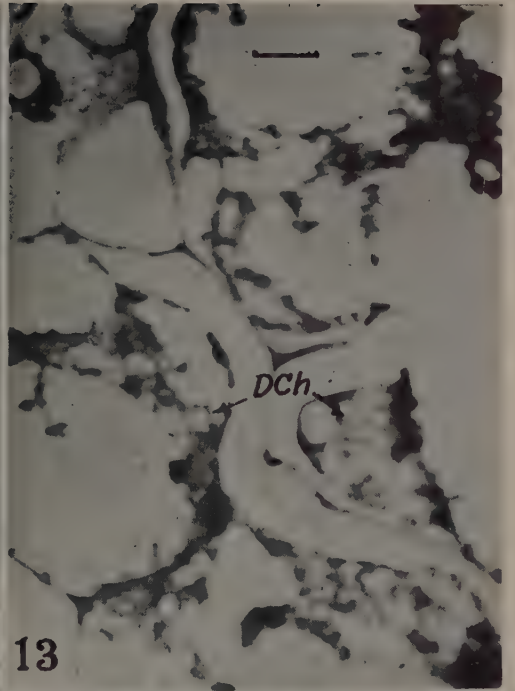


Plate V



An electron microscope study of the wheat leaf cells
infected with the wheat mosaic virus,
Marmor Tritici HOLMES *

TOKUZO HIRAI and CHIAKI MATSUI **

Introduction

In the previous communication engaged in the electron microscopic observations of the tobacco mosaic virus-infected tobacco leaf cells, the junior author has presented the evidence that the masses of the virus rod particles can be demonstrable within infected cells without any association with the disintegrated chloroplasts⁽¹⁰⁾. Whereas, a number of publications indicating that the virus particles may be duplicated in chloroplasts had already appeared^(2,8,9). For this reason, a study was designed to verify this discrepancy. Furthermore, this observations may throw considerable light on the subject whether viruses can be visualized within inclusion bodies or not, which seemed to be still open to discussion. Since the infected wheat cells have been found to contain many of the typically organized cell bodies, they would furnish a suitable material for solving this question.

Materials and method

The healthy and affected wheat plants, variety Nanbukomugi, were supplied from the Morioka Experimental Farm, Tohoku National Agricultural Experiment Station. The virus was identified as wheat mosaic virus (yellow type), which had been referred to as *Triticum Virus* 1A by SMITH⁽¹²⁾.

The procedures of fixation, embedding, and sectioning were completely the same as previously reported⁽⁷⁾. Sections 20 to 50 m μ in thickness were cut with a specially sharpened steel knife in a Spencer type thin sectioning microtome manufactured by the Nippon Microtome Laboratory, Ltd., and were examined without removing the plastic. Electron micrographs were taken with an TRS type electron microscope (Akashi Manufacturing Co., Ltd., Japan) at original magnifications of 2,000 to 5,000 diameters and were enlarged photographically to the desired size.

Observations

1. Uninfected leaf cells

Some of the results obtained from the thin sections of the uninfected leaf tissues are illustrated in Figures 1-5. The epidermal cells contained the vacuolar elements and the cytoplasmic network, the latter was found to lie in a thin layer along the cell walls as shown in Fig. 1. In mesophyll cells, the sharply defined chloroplasts were also identified

* Nature of virus infection in plants. VIII

** Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Nagoya University, Anzjo, Japan.

Received for publication on 21st Aug. 1956.

Forsch. Gebiet Pflanzenkrankh., Kyoto, 6 (2): 61-72, 1956.

which consist, in a commonly accepted manner⁽⁴⁾, of lamellated grana and of osmiophilic granules (Figs. 2-3). Unlike our previous results on the ultrathin sections of rice leaf tissues⁽⁷⁾, the rod or small spherical granules in shape were demonstrated closely packed to the chloroplasts (Figs. 2-3, indicated at mt). These cell organelles were characterized generally a surface membrane and a system of almost parallel spaced ridges protruding from the inside surface of the membrane towards the interior⁽¹³⁾, but otherwise they were not evident as to their internal matrix.

In addition, the thin sections of the vascular bundle in leaves, especially those of phloem parenchymatous cells revealed that the same specialized granules as have been seen near chloroplasts, which are believed, in this case, to be mitochondria or sphaerosomes, are virtually major feature in these cells (Fig. 4). Fig. 5 shows a nucleus in the mesophyll cells of uninfected leaf tissues. Although the nucleolus was not evident, the chromatin which exhibits a high electron density and the ground substances of nuclei (nucleoplasm) could be clearly demonstrated.

2. Infected leaf cells

The morphology and structure of the inclusion bodies, so-called the X-bodies, in wheat cells incited by the present virus have been intensively studied using the light microscope. Furthermore, the chemical nature of the bodies and the significance for their existence *in vivo* have already been discussed^(5,6). With the electron microscopy, these cell bodies again attracted our considerable attention (Figs. 6-8). They were easily recognizable as well in the epidermal cells (Fig. 8) as in the mesophyll ones (Figs. 6-7), and were localized as being either closely associated with nuclei (Fig. 6) or independent of them (Fig. 7).

In these bodies, both the vacuoles that were empty to the electron beam and their ground substances could be differentiated. Particularly, the latter was found to be composed of the many units of the same general size and density (Fig. 7), where infrequently the dense nodules (labelled gr in Figs. 6 and 8), and the small spherical elements of unknown nature (labelled uk in Figs. 7 and 8) were involved. As far as the present evidences concern, however, no virus or virus-like particles were situated within these bodies.

It has been generally accepted that the disintegration of chloroplasts is a phenomenon of frequent occurrence in the virus-infected leaf cells^(10,11). Similarly, in the present electron micrographs, the chloroplasts in the diseased leaf cells were observed to be almost unexclusively undergoing disintegration (Fig. 9, cf. with Figs. 2-3). The grana, the characteristic constituent of chloroplasts, exhibited the complete disruption of their lamellated structure and were released into the each unit of them, probably into the each disk, which was dispersed throughout large portions of the cell (Figs. 10-12). On close examination, the minute round particles, much smaller than a granum in size, were often observed to be interspersed among these isolated grana (Figs. 10-13, arrows). An enlarged micrograph (Fig. 13) indicates reasonably that these particles have the dimensions of order of about 30-50 m μ diameter. Except the features just outlined, no supporting evidences accountable for existence of virus-like particles either in rod-shaped or in spherical were presented.

Discussion

SKOTLAND and his collaborators⁽¹¹⁾, working on the TMV-infected tobacco leaf cells, have reported that they could not determine whether or not the virus particles were

situated in the X-bodies, which appeared as dark granular structures. Their micrograph showing what is believed to be a X-body, is undoubtedly in good accordance with our observations (Fig. 7). It has been found by BLACK et al.⁽²⁾, however, that a cell body which has a well-defined membrane, contains the virus particles, although they were unable to determine whether this body is a chloroplast or an inclusion body.

Our present electron micrographs were of comparatively high enough resolution to differentiate some of the units within these cell bodies (Figs. 6-8). Nevertheless, virus-like particles in question could not be identified in these bodies.

HIRAI et al.⁽⁶⁾, using a light microscope, have suggested that the virus may be localized within the inclusion bodies that found in infected wheat leaf cells, deducing from the following facts; i. e., 1) the inclusion bodies were well stainable by the GIEMSA method described by BALD⁽¹⁾. 2) some of the crystalline inclusions, which were assumed by histochemical reactions to be the virus itself, were occasionally recognized within the vacuole of the bodies. It has recently become increasingly clear that the inclusion bodies caused by the animal viruses, for example, the azurophilic inclusions in the ectromelia-EHRlich mouse ascites tumor cell system, contain the developmental virus⁽³⁾.

Despite of these accumulating evidences, our electron microscopic observations were unsuccessful to arrive the consistent results. However, it should be remembered that the wheat mosaic virus has not yet been purified, and its ultramicroscopic feature remains still unknown either *in vitro* or *in vivo*. Accordingly, it may be well understandable that much efforts to search the virus particles within the inclusion bodies met with little success. Further informations need to be extended for a more effective approach to this problem.

We have already showed that a number of the minute round particles are scattered randomly in the infected cells suspending among the dispersed grana (Figs. 10-13, arrows). SKOTLAND et al.⁽¹¹⁾ have observed the small particles within the TMV-infected cells, and have identified them as remains of grana or the stromatic spherical inclusions. Our enlarged micrographs (Figs. 12-13) seem to make clear the nature of our round particles as being the completely discrete component that differs from grana in size, shape, and density. These particles could never be found within intact chloroplasts nor in healthy cells, except the osmophilic granules in the former (ref. in Figs. 2-3).

Although the decision must be reserved whether these particles are one stage of the developmental virus or merely the stromatic elements, such knowledge as obtained from the present observations might yield clues to clarify the several aspects of virus multiplication within chloroplasts, one of the most important subjects involved in this investigation. In order to overcoming the serious problems of virus multiplication *in vivo*, new fundamental research and ideas may be necessary.

In the unaffected leaf cells, we have found the spherical or rod-shaped granules in the proximity of chloroplasts (indicated in Figs. 2-3, mt). These cell organelles will perhaps belong to mitochondria or sphaerosomes from the standpoints of their internal structures and as well as of their morphology. Of course, more precise determination must be needed in future.

The authors' sincere thanks are due to Mr. Kazuichi KUDO, Morioka Experimental Farm, Tohoku National Agricultural Experiment Station and also to Mr. Hiromu OKAMOTO, Chugoku National Agricultural Experiment Station, for their kindness of selecting the experimental samples.

Résumé

1. The ultrathin sections of the wheat leaf cells infected with the wheat mosaic virus, *Marmor Tritici* HOLMES, were observed through an electron microscope.

2. In the infected leaf cells, the disintegration of chloroplasts was predominant. Moreover, a number of the small round particles were observed to be interspersed among the isolated grana, which could not be determined whether to be the virus or a plastid component.

3. Both in epidermal and in mesophyll cells, so-called X-bodies were recognized, the internal structures of which were consisted of some of the different units. So far as the present observations concern, the virus or virus-like particles could not be identified within these cell bodies.

4. Rod-shaped or spherical granules showing the detailed structural organization were evident near chloroplasts in the uninfected leaf cells, which were thought to be mitochondria or spherosomes.

Literature cited

1. BALD, J. G.: *Phytopathology*, 39: 395, 1949.
2. BLACK, L. M., C. MORGAN, and R. W. G. WYCKOFF: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 73: 119, 1950.
3. DOHI, S.: *Virus (Japan)*, 5: 242, 1955. (in Japanese with English summary)
4. GRANICK, S.: *Handbuch PflPhysiol.* (Ed. W. RUHLAND), Springer-Verlag, Berlin, 1: 507, 1955.
5. HIRAI, T.: *Forsch. Gebiet PflKrank.*, Kyoto, 5: 139, 1956. (in English)
6. —, Y. KOSHIMIZU, and T. KOIWA: *Virus (Japan)*, 2: 257, 1952. (in Japanese with English summary)
7. —, C. MATSUI, and K. ONO: *Forsch. Gebiet PflKrank.*, Kyoto, 6: 49, 1956. (in English)
8. KAUSCHE, G. A. and H. RUSKA: *Naturwissenschaften*, 28: 303, 1940.
9. LEYON, H.: *Exptl. Cell Research*, 4: 371, 1953.
10. MATSUI, C.: *Virus (Japan)*, 6: 357, 1956. (in English)
11. SKOTLAND, C. B., D. J. HARGEDORN, and M. A. STAHMANN: *Phytopathology*, 45: 603, 1953.
12. SMITH, K. M.: *Textbook of Plant Virus Diseases*, Churchill, London, p. 450, 1937.
13. STEFFEN, K.: *Handbuch PflPhysiol.* (Ed. W. RUHLAND), Springer-Verlag, Berlin, 1: 574, 1955.

Explanation of plates

Plate VI

Fig. 1. Thin section of the epidermal cells in the uninfected wheat leaf. ep: epidermal membrane, va: vacuolar elements, cy: cytoplasmic organelles, ch: chloroplasts in mesophyll cells. $\times 8,900$

Figs. 2-3. Chloroplasts in the uninfected wheat leaf cells. ch: chloroplasts, where the lamellated structure of grana is evident, mt: mitochondria or sphaerosome-like granules, cm: cell membrane. $\times 29,000$

Plate VII

Fig. 4. Thin section of the vascular bundle in the uninfected wheat leaf, showing mitochondria or sphaerosomes in phloem parenchymatous cell. Insets show the various aspects of the same particulates. mt: mitochondria or sphaerosomes, cy: cytoplasm. $\times 29,000$

Fig. 5. Nucleus in the mesophyll cell of uninfected wheat leaf. Nucleolus is not observed, but chromatin is evident. $\times 21,000$

Plate VIII

Fig. 6. Electron micrograph of the infected mesophyll cells, illustrating a nucleus together with an inclusion body. nu: nucleus, ib: inclusion body, where the dense granule (gr) is involved. $\times 9,100$

Fig. 7. Thin section of the inclusion body caused by the wheat mosaic virus. va: vacuole, uk: granules of unknown nature. $\times 13,000$

Plate IX

Fig. 8. The inclusion bodies in the epidermal cells of infected wheat leaf. gr: dense granule, uk: granules of unknown nature. $\times 5,500$

Fig. 9. The disintegrated chloroplast in the infected wheat leaf. The lamellated structure of grana is partially destroyed (cf. with Figs. 2-3). $\times 41,000$

Plate X

Fig. 10. The disintegrated chloroplasts in the infected wheat leaf. The left hand is partially disintegrated, and the right hand is completely disintegrated, where the small round particles are evident (arrows) together with some of the dispersed grana. $\times 18,000$

Fig. 11. The disintegrated chloroplasts and the dispersed grana in the infected wheat cells. The small round particles are indicated by arrows. $\times 7,600$

Plate XI

Fig. 12. The dispersed grana in the infected wheat cells and the small round particles suspending among them (arrows). $\times 9,900$

Fig. 13. Enlarged micrograph of the dispersed grana. Small round particles (arrows) are also included. $\times 28,000$

Bar shows the length of ca. 1μ .

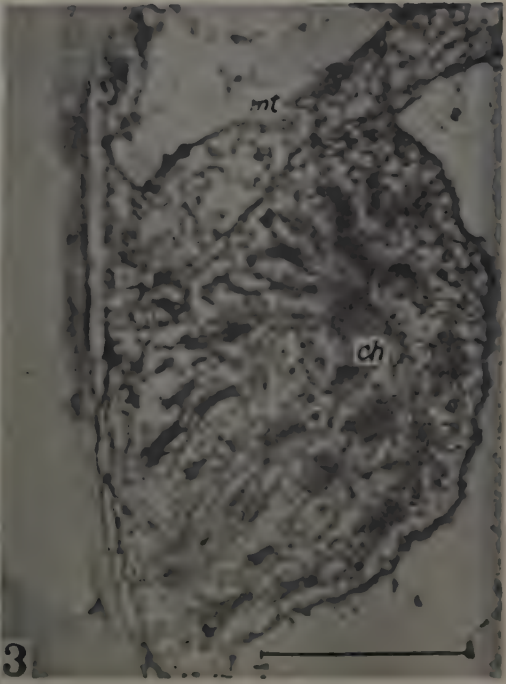
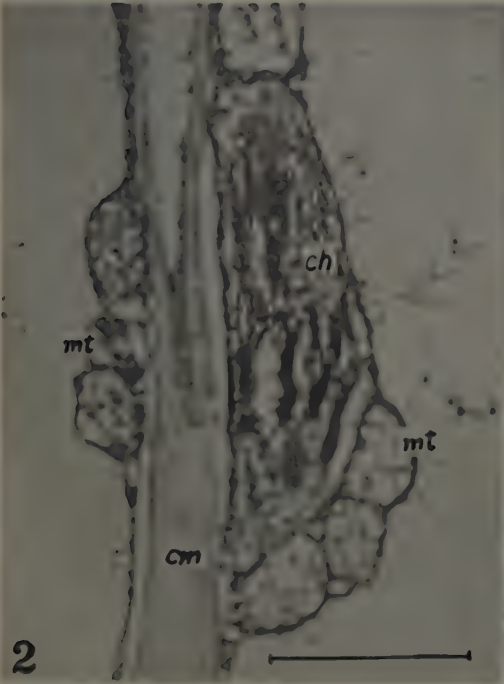
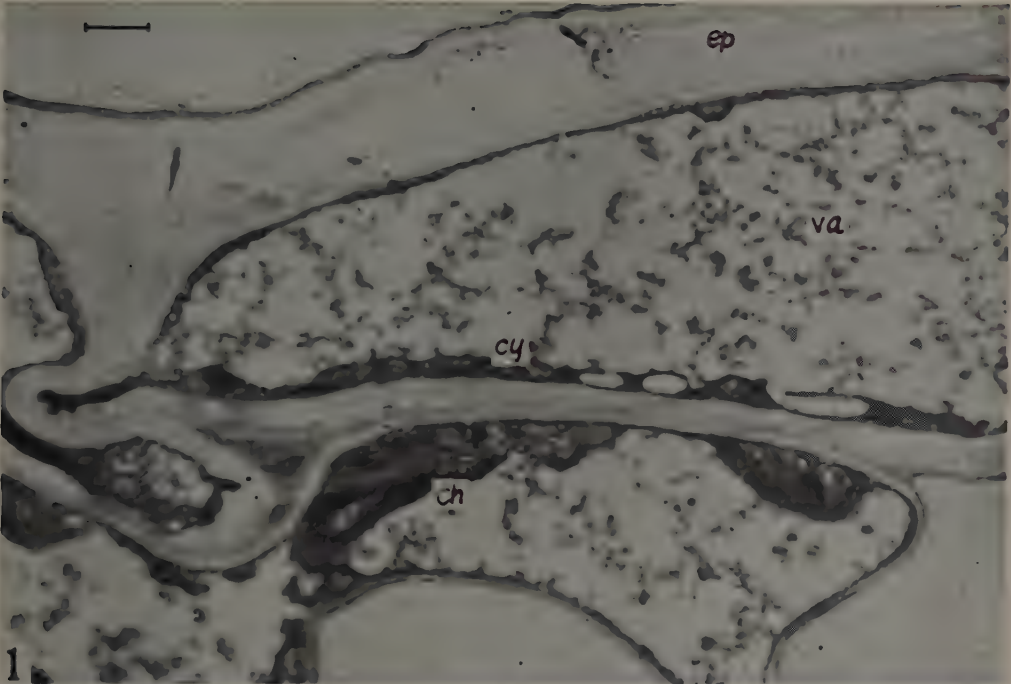


Plate VII

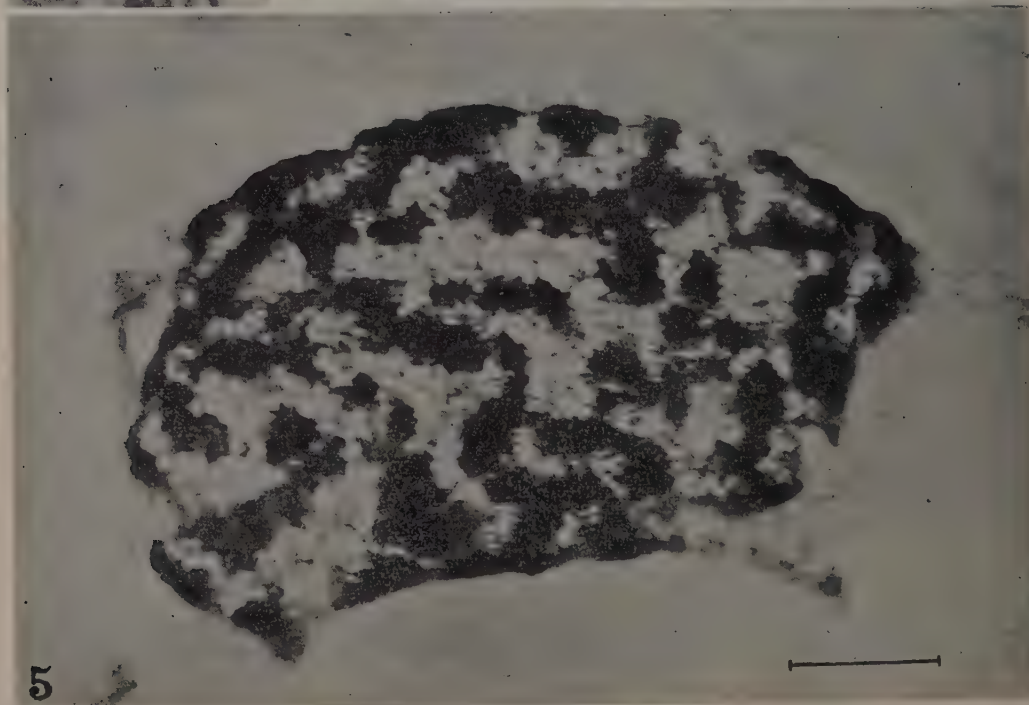
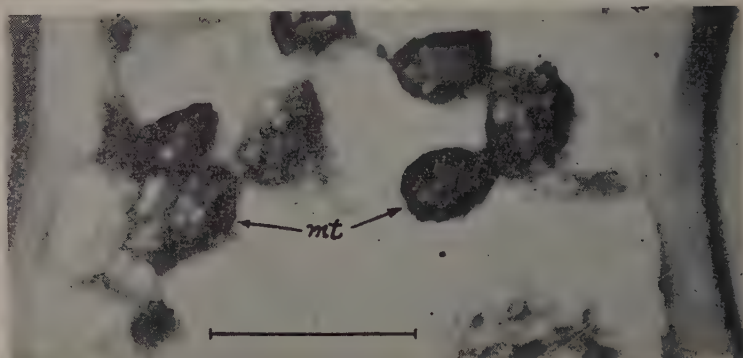
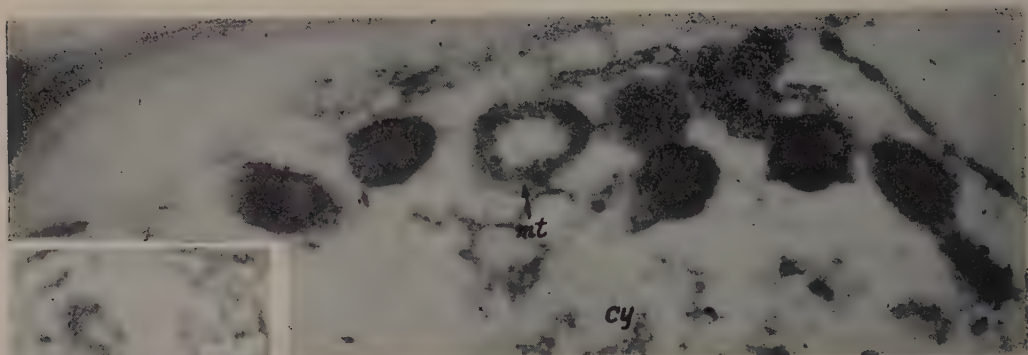


Plate VIII

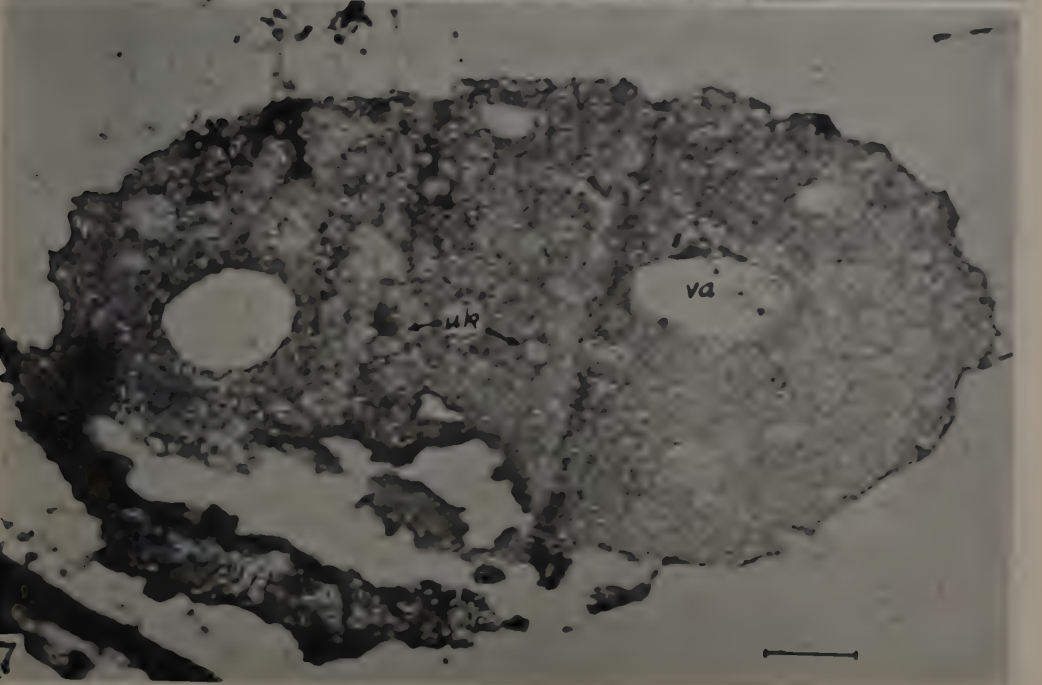
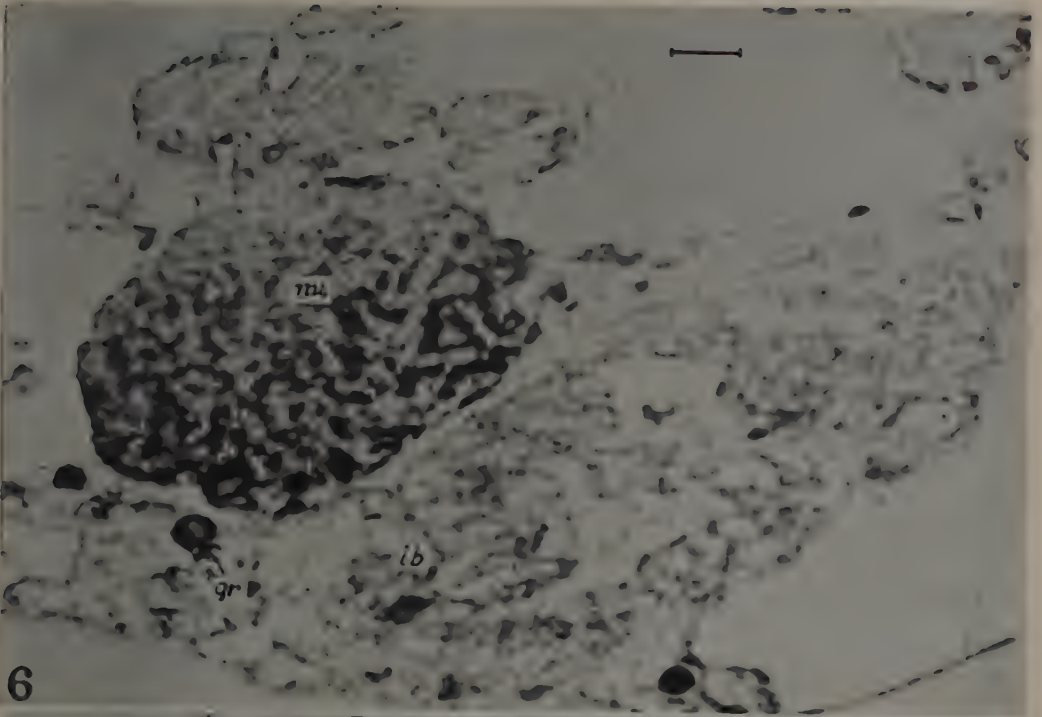
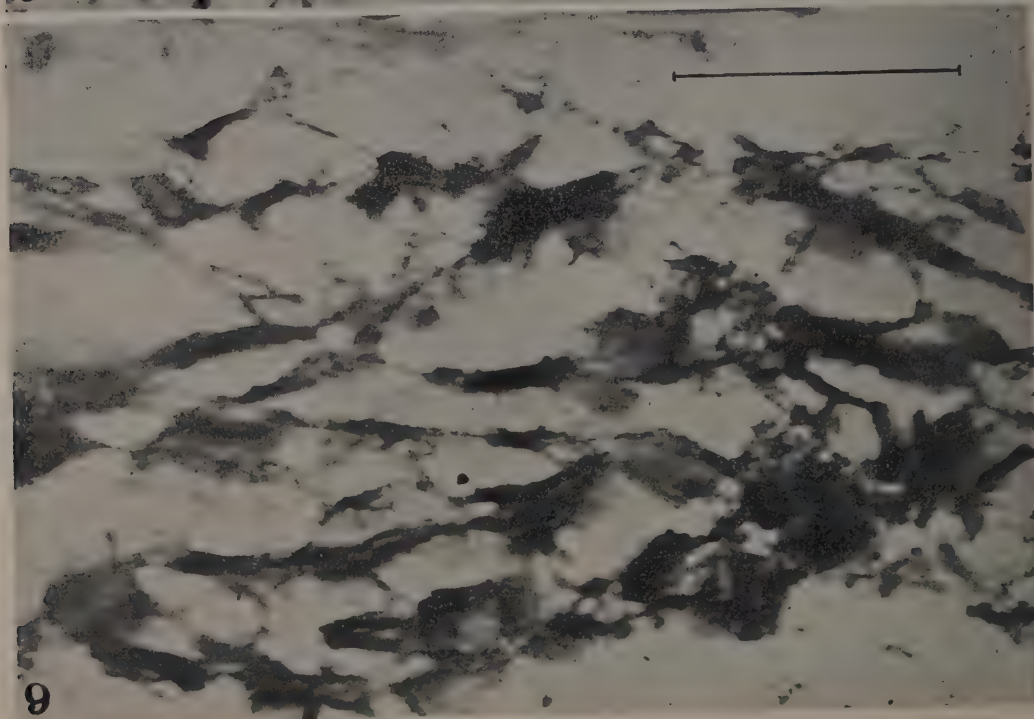
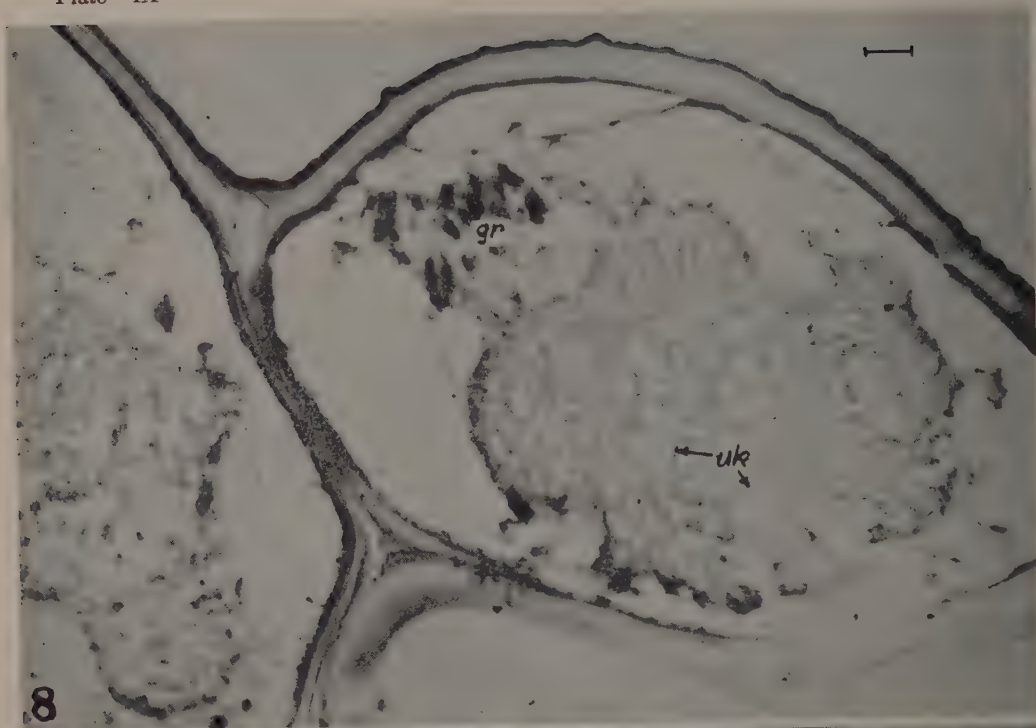


Plate IX



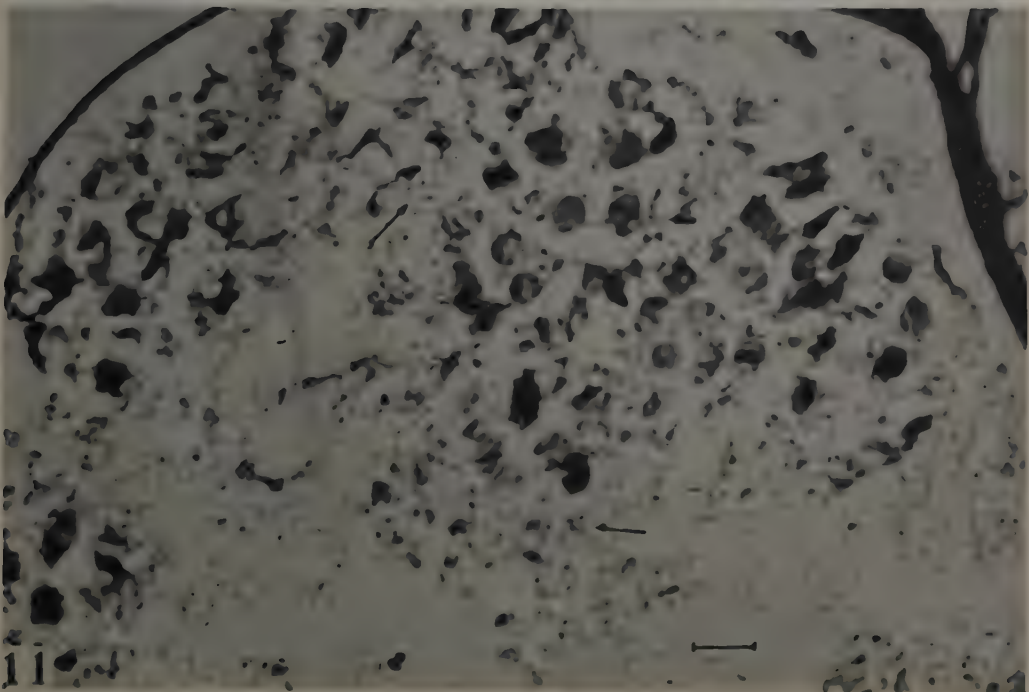
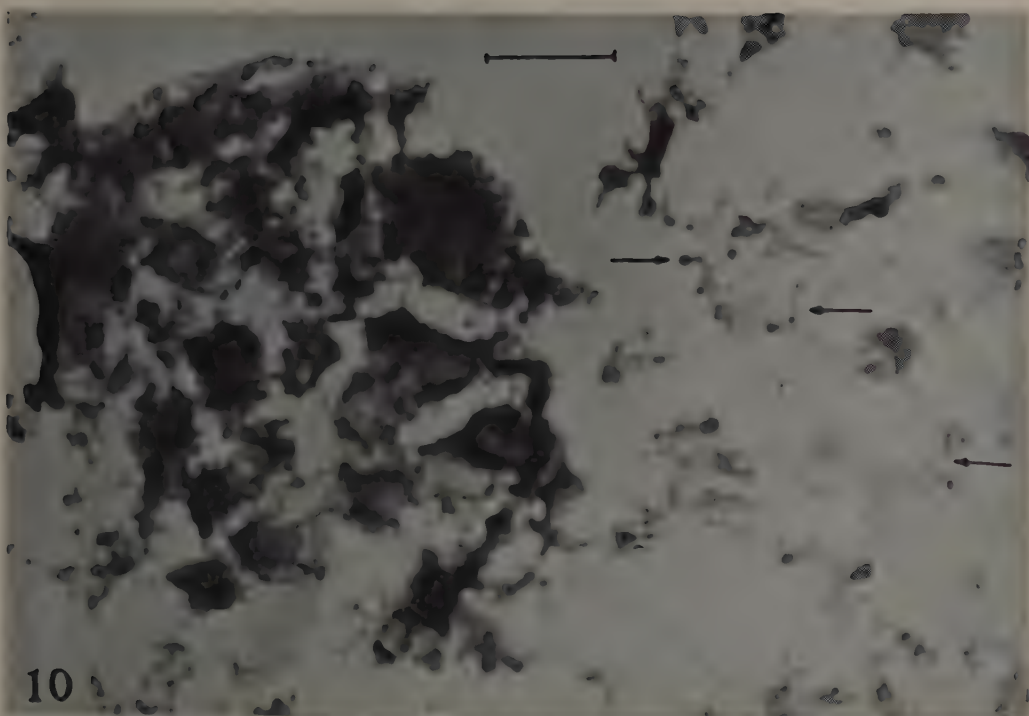
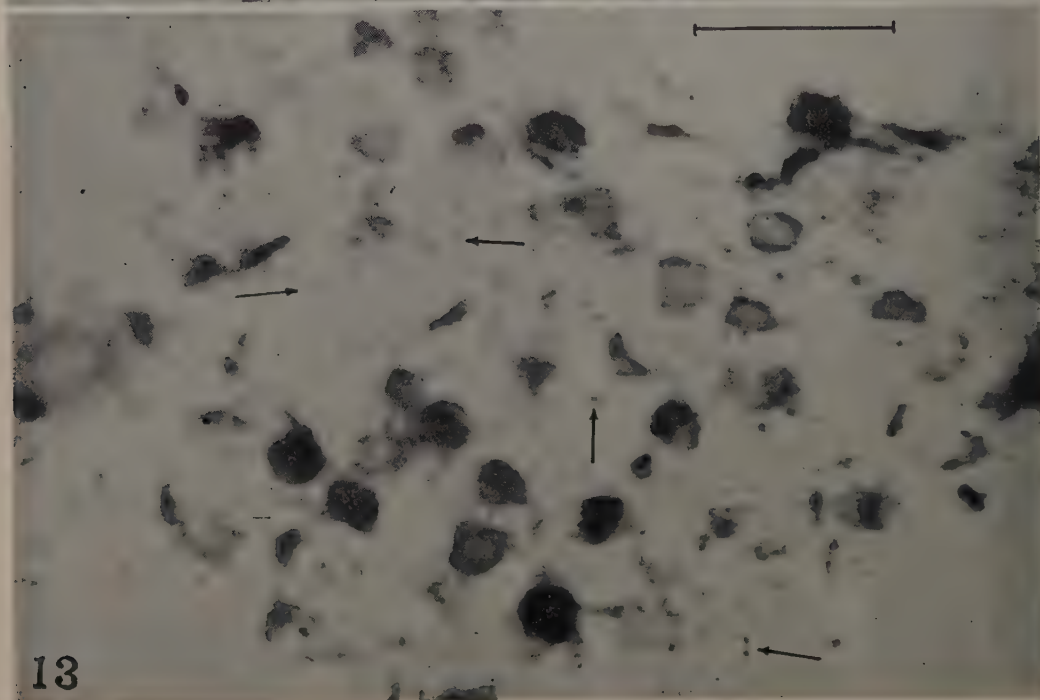
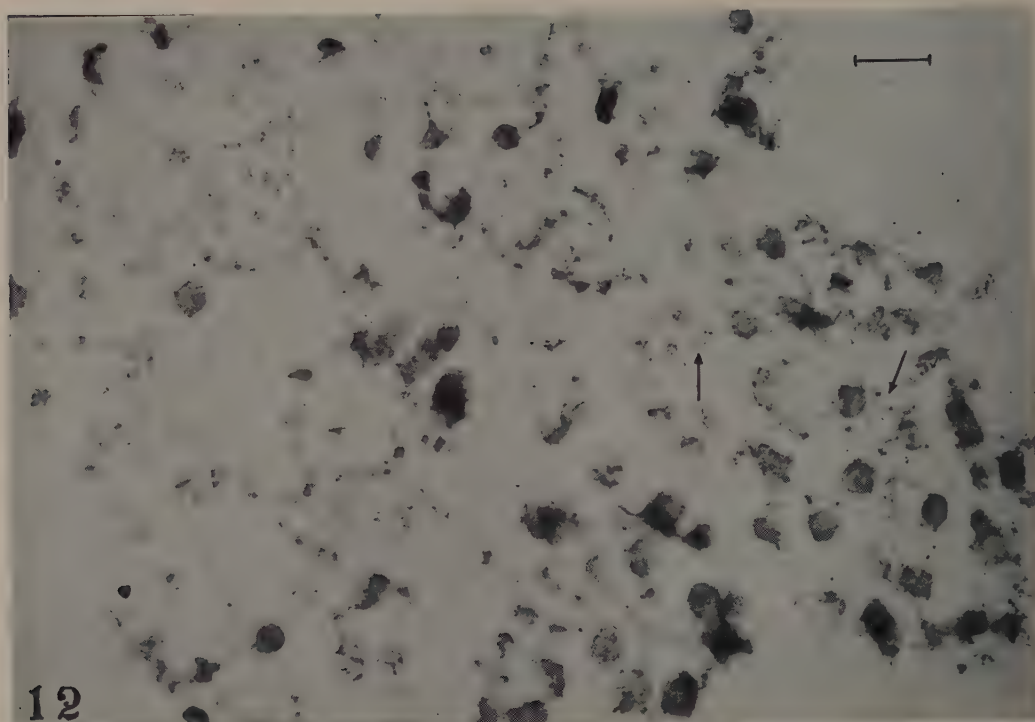


Plate XI



植物のウイルス感染機作 (VI) P³² のウイルス及び細胞内への incorporation

下 村 徹・平 井 篤 造*

Toru SHIMOMURA and Tokuzo HIRAI: Nature of virus infection in plants. (VI)
The incorporation of P³² into host cells and tobacco mosaic virus nucleic acid.

細菌ウイルスでは、その増殖機構を解明する手段として、培地に P³² を添加して新生ウイルスの核蛋白の由来が論ぜられ(7, 10, 11, 12), 又ウイルス自体を P³² でラベルしてその行方が追跡されている(8, 10, 11). 一方植物ウイルスでは、感染時の磷酸代謝についての研究が少く、従つて P³² が利用された例はまれである(15).

筆者等(17)は先にウイルス感染過程に於ける植物体内の磷酸各劃分を調べ、核酸磷の著しい増加を中心とする多少の変動を知り、又細胞構成要素の遠心劃分により、ウイルス生成の場についても考察した。今回は P³² を添加した液にタバコ葉を培養し、タバコモザイクウイルス(TMV)接種葉に於ける磷酸各劃分及び生成ウイルスへの P³² の incorporation を実験した。又有機及び無機磷の動きを明確にする為、LEPAGE and UMBREIT(13)に準ずる各劃分について検討した。更に感染細胞の遠心劃分及び autoradiography により、細胞及び組織内への P³² の incorporation も調べたので、これらの結果について報告する。

1. 磷酸各劃分及びウイルスへの P³² の incorporation

Table 1. Amounts of phosphorus compounds and radioactivity in each fraction of uninoculated and TMV-inoculated tobacco leaf halves cultured in water containing P³².

Phosphorus* compounds	Uninoculated leaf			Inoculated leaf			Isolated virus**		
	P µg	Counts min	Counts min. P µg	P µg	Counts min	Counts min. P µg	P µg	Counts min	Counts min. P µg
Acid soluble P	107.9	198220	1837	85.9	181420	2112	0	—	—
Lipid P	14.3	6040	422	12.6	4860	386	0	—	—
Nucleic acid P	10.8	4960	459	22.0	12260	557	8.8	6440	732
Protein P	2.0	540	270	3.3	920	279	0.4	100	250

* Phosphorus compounds were fractionated by the method of SCHNEIDER and P was determined by ALLEN's method.

** Virus was quantitatively isolated from sap by precipitating with 1/4 saturated (NH₄)₂SO₄ and at PH 3.4.

*** Figures represent the amounts of phosphorus or radioactivities per 50% homogenate 1 ml of leaf tissue cultured for 6 days.

* 名古屋大学農学部植物病理学教室。 昭和31年(1956)7月20日受領
Forsch. Gebiet Pflanzenkrankh., Kyoto, 6 (2): 73-79, 1955.

成熟したタバコの切取葉を中肋から二分し、半葉に TMV を接種、半葉は対照とした。接種対照両葉はそれぞれ別のシャーレ内の液上に浮べ、これを 24°~25°C の恒温箱におさめ、蛍光灯で連続照射した。液は水 1 l 中に P³² 200~300 µc, KH₂PO₄ 0.1 g を含むものである。接種 6~7 日後、湿重に対して同容の水を加え乳鉢中で磨碎し、ガーゼで濾し、得た汁液を SCHNEIDER (18) による各磷酸劃分に分けて、ALLEN (1) により磷酸の比色定量を行つた。一方各磷酸劃分の radioactivity をガイガー計数器で測定した。又同じ汁液について、硫酸の 1/4 飽和による塩析と水抽出を反覆して、最後に pH 3.4 でウイルスを沈澱し、これを SCHNEIDER の各磷酸劃分に分ち、磷酸量及び radioactivity を測定した。塩析後の沈澱は 6,000 r. p. m. 15 分の遠心でおとし、水抽出后には 10,000 r. p. m. 20 分の高速遠心を行つて、可及的にウイルス以外の夾雜物を除いた。分析結果の 1 例を表示すると第 1 表のようである。

後述の様に感染組織の autoradiography では核への P³² の incorporation が著しく、DNA の turnover の促進

Table 2. Amounts of phosphorus compounds and radioactivity in each fraction of uninoculated and TMV-inoculated tobacco leaf halves cultured in water containing P^{32} .

Phosphorus compounds	Uninoculated leaf			Inoculated leaf			Isolated virus		
	P μ g	Counts min. P μ g	Counts min. P μ g	P μ g	Counts min	Counts min. P μ g	P μ g	Counts min	Counts min. P μ g
Acid soluble P	189.2	98140	518	198.0	96080	484	0	—	—
Lipid P	19.0	3620	190	18.1	3280	180	0	—	—
1.0 M $HClO_4$ * extract	7.1	900	126	15.0	2780	184	2.3	540	234
0.5 M $HClO_4$ extract	14.1	1520	106	12.7	1780	140	2.9	480	164
Protein P	2.3	280	120	2.8	240	84	0	0	—

* According to the method of OGUR and ROSEN.

** Figures represent the amounts of phosphorus or radioactivities per 50% homogenate 1 ml of leaf tissue cultured for 7 days.

が予想されたので、酸溶性磷、脂質磷を除いた残渣から OGUR and ROSEN(16) によつて DNA-RNA の分割を企てた。即ち 1M- $HClO_4$ で 5°C, 18 時間抽出して RNA の割分を得、更に残渣から 0.5M- $HClO_4$ で 70°C, 20 分抽出して DNA の割分を得、それぞれ磷酸量及び radioactivity を測定した。結果を第 2 表に示す。

即ち接種葉では核酸磷の著しい増加がみられ、total 並びに磷酸あたりの radioactivity は核酸磷で高い。分離ウイルスには核酸磷のみ存在し、その磷酸あたりの radioactivity は特に高い。BASLER (3) はタバコ葉では OGUR and ROSEN の方法で DNA-RNA を完全に分けることが出来ないと言うが、筆者等の結果も DNA に比して RNA の値が著しく低い。従つて、1M- $HClO_4$ 5°C, 18 時間の抽出では RNA の抽出は不十分と思われた。 $HClO_4$ による両抽出部分共 磷酸あたりの radioactivity

は、対照葉に比し接種葉及び分離ウイルスで常に高い。ウイルス核酸磷で特に P^{32} の turnover rate が高いことから、接種葉に於ける核酸磷及び radioactivity の増加の少くとも一部は、生成ウイルスに直接由来することが考えられる。第 1 表では核酸磷・radioactivity 増加の約 80% が分離ウイルスで説明され、第 2 表ではそれぞれ 80, 47% が説明された。同一実験条件で反覆した結果では、何れも増加核酸磷量・radioactivity の 40~50% 以上はウイルスに見出された。

2. 酸溶性磷化合物への P^{32} の incorporation

酸溶性磷割分を LePAGE and UMBREIT に準ずる方法 (第 1 図) で更に各割分に分ち、各割分の磷酸量及び P^{32} の incorporation を対照・接種両葉間で比較した。各割分の磷は ALLEN により定量し、ガイガー 計数器で radioactivity を測定した。結果の 1 例を第 3 表に示す。

Table 3. Amounts of phosphorus compounds and radioactivity in each fraction of uninoculated and TMV-inoculated tobacco leaf halves cultured in water containing P^{32} .

Phosphorus compounds *	Uninoculated leaf			Inoculated leaf		
	P μ g	Counts min	Counts min. P μ g	P μ g	Counts min	Counts min. P μ g
Residue						
Total P	50.8	10668	210	56.0	12216	216
Ba-insoluble						
Total P	129.0	83740	649	135.8	854800	629
Inorganic P	110.2			120.4		
Organic P	18.8			15.4		
Ba-soluble al- cohol insoluble						
Total P	8.4	3432	408	9.0	4108	456
Inorganic P	2.8			2.6		
Organic P	5.6			6.4		
Ba-alcohol-soluble						
Total P	2.0	1660	830	2.2	1840	836

* Fractionation procedure is shown in Fig. 1.

** Figures represent the amounts of phosphorus or radioactivities per 50% homogenate 1 ml of leaf tissue cultured for 72 hours.

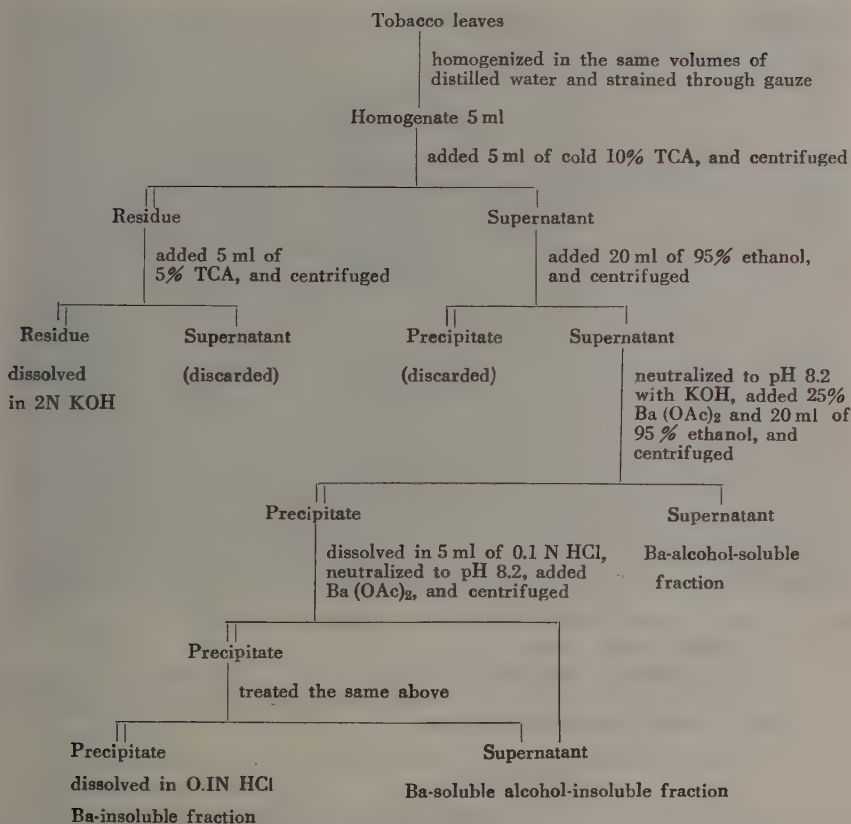


Fig. 1. Fractionation of acid soluble phosphorus compounds

数回反覆した結果から次のことが結論される。残渣は酸不溶性リン化合物で、核酸燐・蛋白燐・脂質燐を含むが、全燐・radioactivity 共に接種葉で常に高い。Ba・アルコール可溶劃分では全燐・radioactivity 共に大差なく、Ba 不溶及び Ba 可溶・アルコール不溶各劃分では全燐・無機燐は感染に伴ってやや増加、有機燐は兩劃分で増加又は減少する場合があります、一定の傾向は得られない。P³² の radioactivity は Ba 不溶劃分では感染葉でやや減少を示し、Ba 可溶・アルコール不溶劃分では増加する場合、減少する場合共にみられた。

3. ウイルス感染組織の autoradiography

前報 (17) で TMV 感染初期に無機燐を含めて全燐酸が増加する傾向がみられ、又培養液中の P³² が生成ウイルス核酸に急速に incorporate することが知られたが、感染に伴いこれら P³² が組織内に如何に分布するかを知る為、次の実験を行つた。水 1 l 中に P³² 200~300 μc ・KH₂PO₄ 0.1g を含む液でタバコを水耕し、同時に

TMV を接種、約 7 日后頂葉にモザイク病斑が出現したので、これを切取つて凍結乾燥し、パラフィン導入后、約 10 μ の切片とし、ストリップ法により autoradiograph を取つた。対照健全葉切片では、維管束部にのみ P³² の集積が見られるが、感染葉ではその他葉緑粒及び核に黒化が認められた。殊に感染による破壊葉緑粒上では P³² の incorporation が甚しかつた (第 2 図)。

4. 細胞構成要素の遠心分割と各劃分への P³² の incorporation

Autoradiography の結果から、感染葉では核・葉緑粒、特に破壊葉緑粒への P³² の集積が著しいことが知られた。故に細胞構成要素の遠心分割により葉緑粒の劃分を得ると、感染葉でのみこの部で P³² の radioactivity が高いことが予想される。

切取葉を 5 日間培養后、湿重に対して同容の 0.5M 蔗糖液を加え、ホモゲナイザーで氷冷下 1 分間磨碎し、これをガーゼで濾過、得た汁液を第 3 図によつて沈澱 1・沈

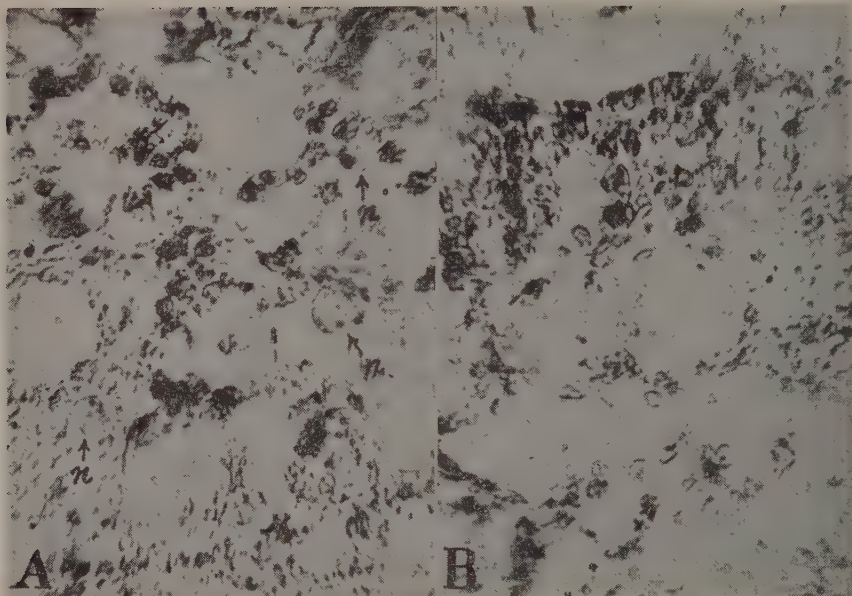


Fig. 2. (A and B) Autoradiographic localization of intracellular P^{32} which was introduced into TMV-infected tobacco leaves.

Fuji autoradiographic stripping film, Exposure 3 weeks. The section was cut at 10μ , not stained, note the chloroplasts and sometimes nuclei (n) in leaf palisade parenchyma show the heaviest radioactivity. $\times 1,000$

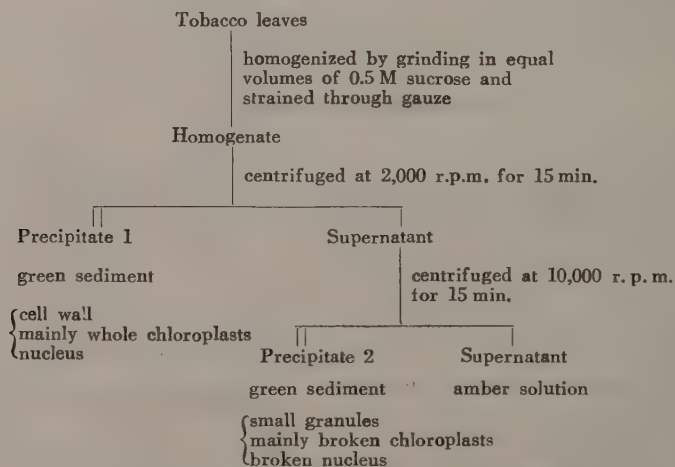


Fig. 3. Fractionation of tobacco leaf homogenate.

澱 2・上澄に分けた。

沈澱 1 及び 2 は、0.5M 蔗糖溶液で洗滌後、原容量に蔗糖液を加え、これを 1 ml とつて分析に供した。各割分は更に SCHNEIDER 法による各磷酸割分に分ち、ALLEN によつて磷酸量を測定し、又ガイガー計数器で radio-

activity を測定した。結果を第 4 表に示す。

各割分で核酸磷を対照・接種両葉間で比較すると、沈澱 1 で差がなく、沈澱 2 では接種葉で磷酸量及び P^{32} の radioactivity 共に増加しているが、磷酸あたりの radioactivity の増加はみられない。これに反して上澄では、核

Table 4. Amounts of phosphorus compounds and radioactivity in various fractions of tobacco leaf homogenate. Uninoculated and TMV-inoculated leaf halves were cultured in water containing P^{32} .

Phosphorus * compounds	Uninoculated leaf								
	Precipitate 1			Precipitate 2			Supernatant		
	P μ g	Counts/min	Counts/min, P μ g	P μ g	Counts/min	Counts/min, P μ g	P μ g	Counts/min	Counts/min, P μ g
Acid soluble P	5.8	880	151	3.2	400	125	189.2	67440	356
Lipid P	6.5	840	129	4.2	460	109	1.3	240	184
Nucleic acid P	11.3	880	77	6.9	720	104	2.8	300	107
Protein P	2.6	180	69	0.8	0	—	0.7	0	—

Phosphorus * compounds	Inoculated leaf								
	Precipitate 1			Precipitate 2			Supernatant		
	P μ g	Counts/min	Counts/min, P μ g	P μ g	Counts/min	Counts/min, P μ g	P μ g	Counts/min	Counts/min, P μ g
Acid soluble P	6.2	780	125	4.8	740	154	206.8	68740	332
Lipid P	5.8	720	124	4.8	700	145	2.4	460	191
Nucleic acid P	10.8	860	79	8.7	960	110	10.6	1420	133
Protein P	2.6	170	65	1.3	80	61	1.2	120	100

* Note in Table 1.

** Figures represent the amounts of phosphorus or radioactivities per 50% homogenate 1 ml of leaf tissue cultured for 5 days.

酸燐, radioactivity 共に著しく増加している。脂質燐の大部は grana に由来すると云われるが (5), 対照・接種両葉共に沈澱 1 > 沈澱 2 > 上澄と葉緑粒の少い割合程低い。接種葉では対照葉に比べ沈澱 1 でやや減少し, 沈澱 2 でやや増加を示し, 沈澱 2 で radioactivity の増加が著しい。以上の様に燐酸各割合沈澱 1 で差が無く, 沈澱 2 及び上澄では接種葉で何れも増加を示した。

5. 論 議

筆者等(17)は TMV を含む 2・3 のウイルスで、感染過程並びに既に病徴の明かな植物について、健全植物に比べて核酸燐の増加、その他の燐酸割合の多少の変動を明かにした。又タバコ切取葉の TMV 感染 3 日後に核酸の turnover が盛んになり、新生ウイルスに P^{32} が incorporate することを知った。今回の実験でこれらを再確認すると共に、核酸燐及び radioactivity の各増加の内少くとも 40~50% 以上は直接生成ウイルスにより説明出来ることを示した。本報での硫酸塩析・等電点沈降法によるウイルスの分離でどれ程のウイルスが回収されるか、又その純度も不明であるが、分離ウイルスは核酸以外の燐酸を含まないし、又ウイルス分離操作中で

の損失を考えると、感染過程での核酸の増加の多くは、生成ウイルスに由来すると考えられる。

接種葉では対照に比べて核酸への P^{32} の incorporation が高く、生成ウイルスではそれが特に高いことから、生成ウイルスの核酸の多くは *de novo* に生成されるらしい。このことは BORN 等 (6) によつて、又別の論拠から BASLER 等 (2) によつて論ぜられた。後者は TMV に systemic に感染したタバコと健全タバコを比較し、葉の全核酸は植物個体間の差が大きい為、感染による変化を認められないとした。併し切取葉の感染過程に於いて、TMV を除く pH 7.0 のバッファー可溶性蛋白で差が無く、バッファー不溶性蛋白では、接種 100 時間後から核酸燐の増加が感染葉でおこり、次いで TMV の急激な出現と共にそれは減少する。筆者等の結果では systemic に感染した葉では核酸燐の著しい増加がみられ、又切取葉では接種 2 日後迄は変化無く、3 日後から常に接種葉で高い値を示した。この場合接種 3 日後からウイルスを分離し得て、接種 6~7 日後迄それは急激な上昇カーブを画くことを確認したが(9), 核酸燐の増加が接種 3~5 日後迄の感染初期に於いても、その大部が生成ウイル

スの存在に負うかどうか、又筆者等の実験条件下で、TMVを除く核酸磷で感染に伴う変動があるかどうか、更に検討の余地があらう。

LEPAGE and UMBREIT に準ずる酸性性磷化合物の各劃分について、接種 3~5 日後に行つた実験の結果では、無機磷・全磷の僅かな増加を認める他、有機磷は変化しない場合、増加又は減少する場合があります、必しも一定の傾向を示さず、radioactivity についても同様である。他に $\Delta 7P$ (7P から無機 P を引いたもの) を測定した結果も一定の変化は認められなかつた。VAYONIS (19) によると、TMV 感染 2 日後にタバコ葉内の磷酸エステルが増加し、その後減少、病徴発現と共に又増加すると云う。筆者等は接種 3~5 日後にその変動の 1 時期をとらえて分析したが、磷酸エステルの様な動き易い劃分は、感染後の変動を日を追つて追究する必要があらう。

従来タバコでの TMV 増殖の場所について色々論ぜられているが (4, 14, 17), 今回の autoradiography の結果は TMV 増殖が葉緑粒と関係あることを示唆する。葉緑粒に集積される P^{32} が如何なる形態の磷酸を含むか明かでないが、接種 5 日後の感染切取葉の細胞構成要素の遠心劃分の結果では、健全葉緑粒を主とする沈澱 1 では、各磷酸劃分で磷酸量・radioactivity は差が無く、破壊葉緑粒を主とする沈澱 2 では、核酸磷で磷酸量・radioactivity 共に増加しているが、磷酸あたりの radioactivity は差が無い。脂質磷では磷酸量・磷酸あたりの radioactivity 共に増加を示した。併しこれら P^{32} の集積と autoradiograph でみられた葉緑粒へのその集積との関係は明かでない。即ち autoradiography で扱われた病徴明かな葉での破壊葉緑粒と、病徴の全くない切取接種葉の遠心劃分での破壊葉緑粒劃分とを比較するのは妥当ではないであらう。又一方細胞構成要素の遠心劃分によつて生じ得る artifact も考慮する必要がある。

6. 摘 要

1. タバコ切取葉を P^{32} を含有する液で培養し、TMV を接種した半葉と無接種の半葉について、磷酸各劃分の磷酸量及び P^{32} の incorporation を比較した。

2. 接種 1 週間後では、接種葉で核酸磷劃分の磷酸量及び P^{32} の radioactivity の増加があり、その大部が生成ウイルスにより説明された。

3. LEPAGE and UMBREIT に準ずる酸性性磷劃分は接種 3~5 日後では、感染に伴う一定の変動を示さない。

4. 細胞構成要素の遠心劃分並びに病葉の autoradiography の結果から、感染葉に於いて P^{32} が incorporate する劃分又は細胞について考察した。

引 用 文 献

1. ALLEN, R. J. L.: Biochem. J., 34: 858-865, 1940.
2. BASLER, E. Jr. and COMMONER, B.: Virology, 2: 13-28, 1956.
3. BASLER, E. Jr.: Thesis, Washington Univ. St. Louis. 1954. Ref. in BASLER E. Jr. and COMMONER, B. (2).
4. BLACK, L. M., MORGAN, C. & WYCKOFF, R. W. G.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 73: 119-122, 1950.
5. BONNER, J.: Plant Biochemistry, Academic Press. 1952.
6. BORN, H. J., LANG, A. and SOHRAMM, G.: Arch. ges. Virusforsch., 2: 461-479, 1943. Ref. in BASLER, E. Jr. and COMMONER, B. (2).
7. COHEN, S. S.: J. Biol. Chem., 174: 295-303, 1948.
8. HERSHEY, A. D. and CHASE, M.: J. Gen. Physiol., 36: 39-56, 1952.
9. 平井篤造・下村徹・松井千秋・山口昭: 植物バイラス病の化学療法に関する研究 (騰写) 1956.
10. KOZLOFF, L. M. and PUTNAM, F. W.: J. Biol. Chem., 182: 229-242, 1950.
11. KOZLOFF, L. M.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 18: 209-220, 1953.
12. LABAW, L. W.: J. Bact., 62: 169-173, 1951.
13. LEPAGE, G. A. and UMBREIT, W. W.: J. Biol. Chem., 147: 263-271, 1943.
14. LEYON, H.: Exp. Cell Reseach, 4: 362-370, 1953.
15. 野中福次: 植物防疫, 10: 144-148, 191-194, 1956.
16. OGUR, M. and ROSEN, G.: Arch. Biochem., 25: 262-276, 1950.
17. 下村徹・平井篤造: Virus, 6 (印刷中).
18. SCHNEIDER, W. C.: J. Biol. Chem., 161: 293-303, 1945.
19. VAYONIS, G. C.: Physiol. Plantarum, 7: 687-697, 1954.

Résumé

In continuation of our previous studies, an experiment was designed to elucidate the rate of incorporation of P^{32} into the various phosphorus fractions and cell components of virus-infected plant leaves.

Both the uninoculated and TMV-inoculated tobacco leaf halves were floated in water containing P^{32} . After 6-7 days, the leaf tissues were homogenized and fractionated into various phosphorus fractions according to SCHNEIDER's method. In Tables 1 and 2 there is evidence that the phosphorus content and specific radioactivity in nucleic acid fraction of inoculated leaf halves exceed the comparable values in uninoculated leaf halves. The data are good enough to suggest that 50 to 80 per cent of the accumulated phosphorus content and radioactivity in nucleic acid fraction of infected leaf was derived from these amounts ultimately found in TMV nucleic acid. Since the P^{32} level found in the synthesized

TMV nucleic acid is considerably higher, it seems quite probable that the virus nucleic acid may be synthesized *de novo*.

The acid soluble phosphorus compounds of leaf homogenates were fractionated by the method of LEPAGE and UMBREIT (Fig. 1). The amounts of phosphorus contents and radioactivities in the various fractions are shown in Table 3. These results seem not to afford a conclusive evidence whether the organic phosphorus contents of leaf disks tend to fluctuate during the virus infection. Rather than this, no consistent differences in trend between the inoculated and uninoculated are evident.

In order to trace the P^{32} incorporation into host cells, experiments to take the autoradiographs of infected leaf tissues which are water-cultured with P^{32} were conducted (Fig. 2). The results revealed

that chloroplasts and nuclei, especially the disintegrated chloroplasts of the infected leaf show a high rate of isotope incorporation which exceed that of uninoculated leaf. It is probably true from these findings that the chloroplasts may be definitely associated with virus biosynthesis.

For the close examination on this subject, the homogenized juice of leaf tissue was fractionated as shown in Figure 3 and the incorporation of P^{32} into the various cell components was determined (Table 4). These data again confirmed, as might be expected, that the relative specific radioactivity of the supernatant nucleic acid is much greater in infected leaf than in uninfected leaf.

Laboratory of Phytopathology
Nagoya University,
Anzō

追記：脱稿後次の文献を得た。PIRIE, N. W.: Biochem. J. 63: 316-325. 1956. (TMV は 4°C , 1 N HClO_4 , 24 時間処理で核酸の % だけが抽出され, 1 N HClO_4 , 20°C では全核酸が抽出される。)

植物のウイルス感染機作 (VII) 感染組織におけるコハク酸酸化酵素系 *

山 口 昭 **

Akira YAMAGUCHI: Nature of virus infection in plants. (VII)
Intracellular localization of succinic oxidase activity in the virus-infected tissues.

ウイルス罹病組織の呼吸については従来数多くの研究があるが(2,5,6,11), その結果には必ずしも一定の傾向がない。即ち組織とウイルスの組合せにより, ある場合は罹病組織が呼吸大となり, 他の場合は健全の方が大となる。その原因にはなお不明の点も少くないが, 呼吸量測定方法(酸素消費量, 炭酸ガス放出量)並びに定量の基礎(生体重, 乾物重, 蛋白態窒素)を異にするこれら研究結果を比較するのは無理であろう。又, たとえ罹病植物を健全植物と同一環境下で育成しても, 個体差や葉位差を除くことは非常に困難である。

筆者は前報(12)で, TMV 接種後4日目までは, トマト葉の脱水素酵素活性及びタバコ葉の酸素吸収量は, 健病間に差のないことを報告した。そこで健病両組織磨碎液の各遠心分劃について呼吸酵素系を調べ, 感染による酵素系の質的な変動を明らかにしようとした。本論文では, まず各種ウイルス罹病組織を用いて, コハク酸酸化酵素系の細胞内所在を調べ, 健全組織との比較を行った結果を述べる。ついで半葉接種, 切り取り培養したタバコ葉磨碎液の酸素吸収量を測定して, 健病間の定量的な比較を行った。

本実験は終始平井教授の指導の下に行われ, 生物化学教室瓜谷助教授, 東大農学部大村京生氏より有益な助言を賜わった。供試植物は, それぞれ日本専売公社日高博士, 愛知県園芸試験場石上孔一氏, 園芸学教室志佐博士から分譲された。共に記して厚くお礼申し上げる。

実 験 の 部

I. 罹病組織におけるコハク酸酸化酵素系の細胞内所在

(1). TMV 罹病タバコ葉

感染後1ヶ月以上経過し, モザイク症状の著しい葉をとり, 生体重と等容量の磨碎液(0.2 M sucrose; 0.01 M phosphate-buffer, pH 7.0)を加え, 氷冷しながら homogenizer ですりつぶす。ガーゼで濾過した汁液を第1図のように遠心分劃した。対照健全葉も同様に分劃した。S₁, S₂ はそのまゝ, P₁, P₂ は 0.2 M sucrose を含む

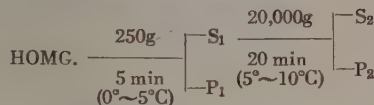


Fig. 1. Scheme for fractionation procedure of the homogenized tobacco leaf tissues.

0.01 M phosphate-buffer に懸濁し, それぞれ 1 ml ずつ vessel に入れ, WARBURG 検圧計を用いて, 暗黒下で酸素吸収量を測定した。

健病両葉とも磨碎液の 250g 上澄液(S₁)は自家呼吸が大きく, 基質(コハク酸ソーダ)添加の影響は認められない。しかし第2図に示す如く, マロン酸の添加で自家呼吸が抑えられるので, 健病両葉ともにコハク酸酸化酵素系の存在が推定される。この fraction を更に 20,000g 遠心の上澄と沈殿に分けると, 上澄液(S₂)は, 加えたコハク酸の酸化を示さず, 沈殿(P₂)のみに, コハク酸添加の影響がみられた。しかし健病共 P₂ の自家呼吸が大きいため, 加えたコハク酸の酸化による酸素吸収量は僅かであつた。実験の一例を第3図に示す。罹病が健全に比し酸素吸収量が少いが, 繰返した実験では逆の結果も得てをり, 個体を異にする健病間での酵素活性の量的比較は適当でない。しかし図から, コハク酸酸化酵素系の性質について, 健病間に本質的な差は無いものと思われる。

(2). モザイク罹病ダイコン根

愛知県園芸試験場(清洲町)圃場に発生した, 葉にモザイク症状を呈するダイコンの根(宮重総太, virus 未同定)を用いた。生体重 30g に 15 ml の磨碎液(0.5 M sucrose; 0.05 M phosphate-buffer, pH 7.0)を加え, 氷冷しながら homogenize し, ガーゼで濾過した汁液を第4図の如く遠心分劃した。健全根も同様に処理した。

WARBURG 検圧計を用いて, 各分劃の自家呼吸及びコハク酸添加の影響をしらべた。磨碎液の 250g 上澄液(S₁)の自家呼吸は, マロン酸によつて抑えられるが, コハク酸添加の影響は顕著でない。一方この fraction の

* 本論文の要旨は昭和31年4月13日 日本植物病理学会大会で講演した。

** 名古屋大学農学部植物病理学教室。昭和31年(1956)8月20日受領
Forsch. Gebiet Pflanzenkrankh., Kyoto, 6(2): 81-86, 1956.

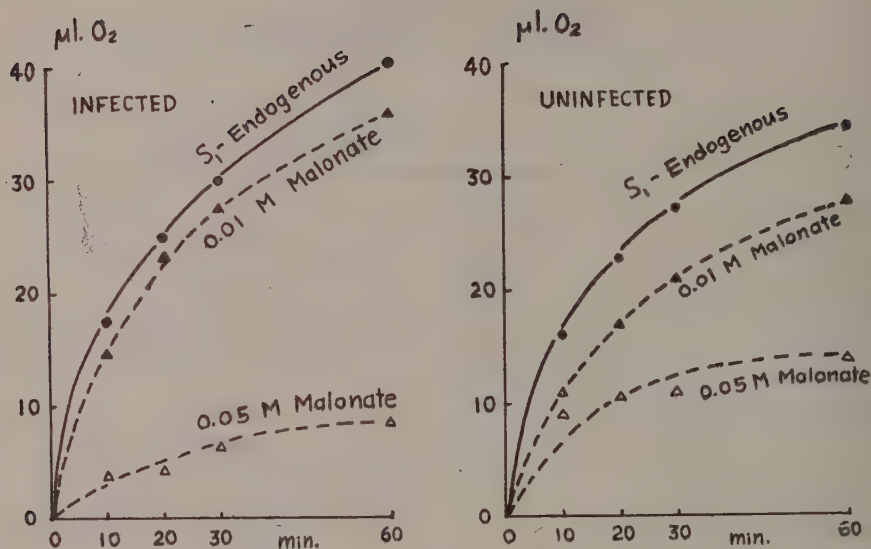


Fig. 2. The effect of malonate on the endogenous oxygen uptake by the TMV-infected and uninfected tobacco leaf homogenates (S_1).

Oxygen uptake was measured by the conventional WARBURG's manometric method. Ingredients are phosphate-buffer, 0.01 M; sucrose, 0.1 M; leaf homogenates (S_1), 1 ml, in the total volume, 2 ml, 30°C, dark. After 10 min. equilibration, malonate (0.01M or 0.05M) was added from side arm at zero time.

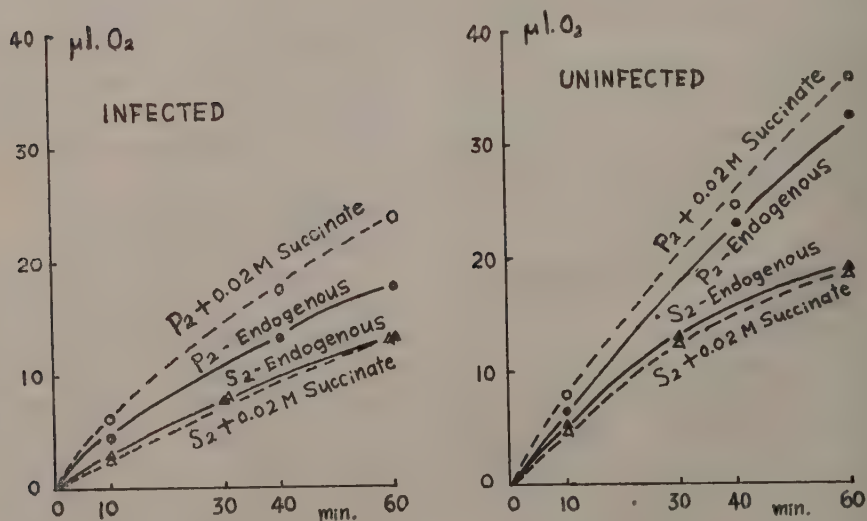


Fig. 3. Effect of succinate addition on the oxygen uptake by the particulate fraction (P_2) and its supernatant (S_2) obtained from the TMV-infected and uninfected tobacco leaf homogenates.

Experimental conditions are the same as in Fig. 2.

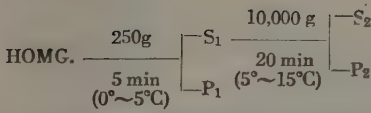


Fig. 4. Scheme for fractionation procedure of the homogenized radish root or tulip bud.

10,000 g 沈澱粒子 (P_2) は、自家呼吸が非常に少く、コハク酸の添加によつて顕著に酸素吸収量の増加を示し、それはまたマロン酸で阻害される (第5図)。これらの諸性

質について、健病両根の間に質的な差は見出されず、ウイルス罹病根でも健全根同様、10,000 g 沈澱粒子にコハク酸酸化酵素系が局在することが示された。

(3). ウイルス罹病チユウリツブ芽

罹病球根 (Charles Needham), 健全球根 (Feu Brilliant) を共に暗黒下で発芽させ、芽を分離する。芽の一定量に倍量の磨砕液 (0.25 M sucrose; 0.025 M phosphate-buffer, pH 7.0) を加えて、homogenize し、第4図のように分割した。

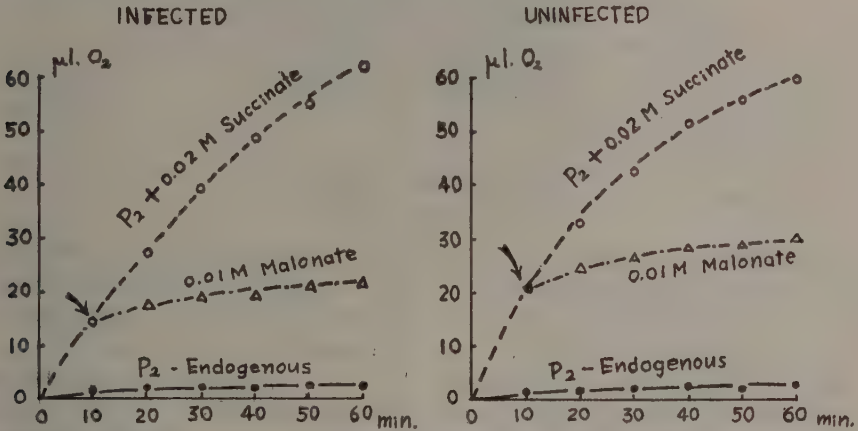


Fig. 5. Succinate oxidation and its malonate inhibition by the particulate fraction (P_2) obtained from the homogenates of the mosaic infected and uninfected radish root. Each vessel contains phosphate-buffer, 0.01 M; sucrose, 0.1 M; succinate, 0.02 M; particulate fraction (P_2), 1 ml, in the total volume, 2 ml, 30°C. Malonate (0.01 M) was added after 10 min. from zero time (indicated by arrows).

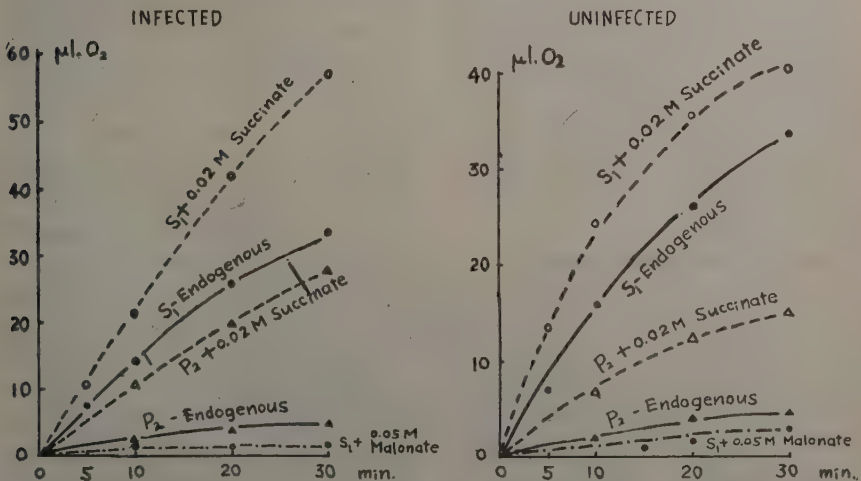


Fig. 6. Succinate oxidation by the homogenates (S_1) and the particulate fraction (P_2) obtained from the virus infected tulip bud.

Experimental conditions are the same as in Fig. 5.

Table 1. Localization of succinic oxidase activity in the various centrifugal fractions from the virus infected plant tissues.

Tissue	Fraction	Endogenous respiration		Effect of succinate addition		Malonate inhibition	
		Inf. *	Uninf. **	Inf.	Uninf.	Inf.	Uninf.
Tobacco leaf	S ₁ (250 g, supt.)	+++	+++	—	—	+	+
	S ₂ (20,000 g, supt.)	+	+	—	—		
	P ₂ (20,000 g, ppt.)	++	++	slightly	slightly		
Radish root	S ₁ (250 g, supt.)	+	+	—	—	+	+
	P ₂ (10,000 g, ppt.)	trace	trace	++	++	+	+
Tulip bud	S ₁ (250 g, supt.)	++	++	+	+	+	+
	P ₂ (10,000 g, ppt.)	+	+	++	++		

* Virus-infected

** Uninfected

磨砕液の 250 g 上澄液 (S₁) の自家呼吸はマロン酸によつて阻害され、且つコハク酸添加の影響が認められる。その 10,000 g 沈澱粒子 (P₂) は自家呼吸が少く、コハク酸添加によつて顕著に酸素吸収量の増加を示す。この場合も、品種を異にする健病球根間で、コハク酸酸化酵素活性の量的比較はできなかつたが、本酵素系の細胞内所在は、健病共に 10,000 g 沈澱粒子で、その点差は認められなかつた (第 6 図)。

以上の結果をまとめて第 1 表に示す。即ちタバコ緑葉では、ダイコン根、チユウリツプ芽などの非緑色組織に比べ、自家呼吸が大きく、コハク酸添加の影響が顕著にあらわれない。しかし健病両葉とも磨砕液の自家呼吸がマロン酸で抑えられ、その 20,000 g 沈澱粒子が、加えたコハク酸を僅かながら酸化する点などからすると、本酵素系に関して健病間に本質的な差は認められないようである。ダイコン根、チユウリツプ芽では、健病共に本酵素系が 10,000 g 沈澱粒子に存在することが明らかになつた。

II. 切取りタバコ葉磨砕液の酸素吸収量

10—13 葉のトルコタバコ (Xanthi) の頂部を切り、8—9 葉を残し、葉の全表面にガラス粉を塗布して一様に傷をつける。各葉とも中肋から半分に TMV 罹病タバコ葉汁液を、残り半分に健全タバコ葉汁液を塗り、鉢植のまま蛍光灯下恒温箱 (20—25°C) に放置する。24 時間後に葉を切り取り、中肋から二分し、健病それぞれシャーレ内の培養液 (KH₂PO₄, 0.2 g; NH₄NO₃, 0.2 g; sulfanilamide, 0.3 g; sucrose, 5.0 g; dist. water, 1 l) に浮かべ、更に 2 昼夜放置する。この間 1 度培養液をと

りかえた。後とり出して濾紙で葉を脱水し、径 7 mm の disk を切り取る。残りを生体重当り等容量の磨砕液 (0.2 M sucrose; 0.01 M phosphate-buffer, pH 7.0) で homogenize し、250 g, 5 分遠心の上澄液を得る。

同一葉からの disk と磨砕液について、酸素吸収量を WARBURG 検圧計を用いて測定し、健病を比較した。同一試料につき manometer 3 本を用い、実験は 6 回繰返した。健全葉に対する接種葉の酸素吸収量の比率を第 7 図に示す。一方無接種の左右両半葉による誤差は、disk、磨砕液それぞれ最大 4%, 12% であつた。即ち TMV 接種後 3 日のタバコ葉 disk では健病間に酸素吸収量の有意差は見られていないが、磨砕液では、明らかに接種葉が健全葉に比し高い値を示した。実験の 1 例を示すと第 8 図のとおりである。

考 察

(1). Mung bean, lupine, cauliflower, sweet potato などの高等植物で、非緑色組織から分離した顆粒成分が、コハク酸などの KREBS cycle 中の有機酸を酸化することが、MILLER ら (8, 9), BRUMMOND ら (3), LATIES (7), AKAZAWA ら (1) によつて次第に明らかになつた。しかし緑葉では、必ずしも非緑色組織と同一でなく、BRUMMOND ら (4) によると、発芽直後の lupine 子苗から得た mitochondria 相当の粒子は、コハク酸を酸化するが、光に 48 時間当てて緑色になつたものは、その能力を失い、その原因は CO₂ の存在によるという。本実験でも、ダイコン根・チユウリツプ芽では、10,000 g の沈澱粒子にコハク酸酸化酵素系の存在することが示されたが、タバコ緑葉では、20,000 g 沈澱粒子の自家呼吸が大きく、コハ

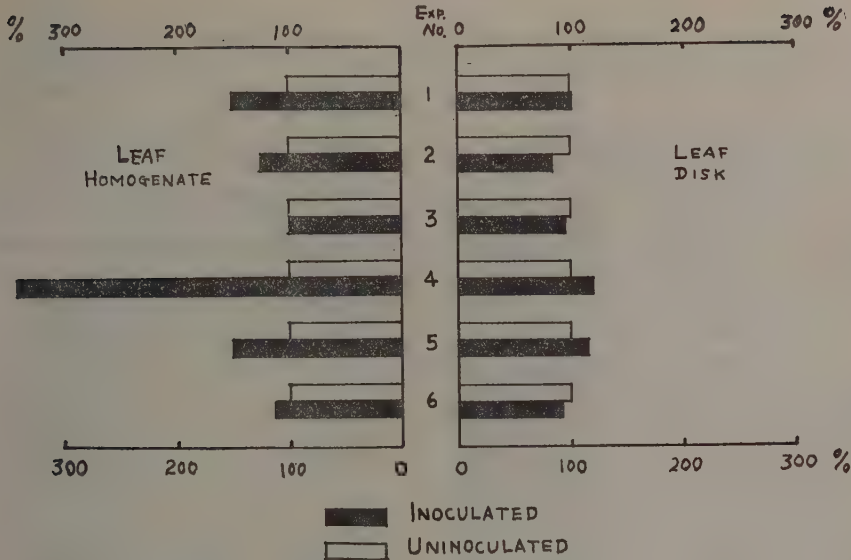


Fig. 7. Percentages of the endogenous oxygen uptake by the TMV-inoculated tobacco leaf-halves to that by the uninoculated ones.

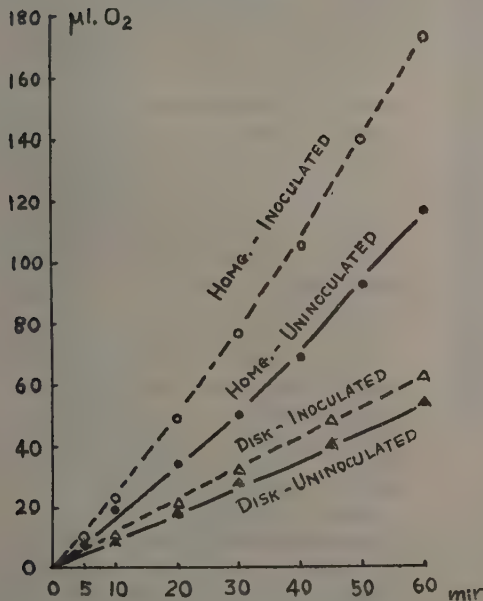


Fig. 8. Oxygen uptake by the leaf disks and the homogenates obtained from the TMV-inoculated and uninoculated tobacco leaf-halves cultured in the nutrient solution.

Ten disks (7 mm in diameter) were put into or one ml of leaf homogenates was added in each WARBURG's vessel containing 0.01 M phosphate-buffer and 0.1 M sucrose in the total volume 2 ml. Gas phase, air; Temp. 30°C; 10 min equilibration; dark; 3 days after inoculation.

ク酸添加の影響は僅かであつた。一方 OHMURA (10) は、ホウレンソウ緑葉の顆粒成分が容易にコハク酸を酸化し、更にその反応が phosphorylation と共軛することを証明している。この緑色部と非緑色部の相違の原因は、前者では呼吸酵素系の性質やその細胞内所在が非緑色組織と本質的に違っていることによるのか、それとも組織を磨碎する条件、特に緑葉の酵素系を保存する磨碎条件

が確定していないことによるのか、今の処不明である。

(2). 各種組織の各 fraction の自家呼吸量及びコハク酸添加による酸素吸収量を、健病の間で、生体重を基として定量的に比較した結果は、常に一定の傾向が得られなかつた。即ち或る場合は健全が罹病より大であり、他の場合は逆の結果又は等しい結果を得た。これは比較に供する健全と罹病との個体差によるものであろう。

したがつてこの種の実験では、できるだけ均一な状態で育成した植物を比較に供し、磨砕・遠心などの操作にも十分の注意を払わねばならない。

(3). そのため TAKAHASHI (11) は、半葉接種したタバコ切取葉を培養液に浮かべる方法を推奨している。本実験でもこの方法を用いた結果、disk (生葉) の酸素吸収量は、接種後3日で健病間に差無く、TAKAHASHI と同様の結果を得た。しかるに葉の磨砕液では、接種葉の酸素吸収量が健全葉より高い値を示した。この原因として、i) 接種葉では呼吸酵素活性が高まっているが、本実験に用いた disk では検出できず、磨砕によつて組織内外の呼吸基質が利用され易い状態になつたこと、ii) 生葉内の呼吸酵素活性には健病間に差がないが、接種葉では、磨砕の結果酸素吸収を示すような酵素の活性が高まつたこと、などが考えられる。この点は、TMV の増殖初期に、エネルギー源としての呼吸酵素活性が、生葉中でどうなっているかを明らかにするためにも、更に検討を要する問題であらう。

摘 要

(1). TMV 罹病タバコ葉、未同定のウイルス罹病ダイコン根、チユウリツプ芽の磨砕液を遠心分割し、各分割の自家呼吸及びコハク酸酸化を測定して、コハク酸酸化酵素系の細胞内所在を調べ、健全組織のそれと比較した。

(2). タバコ緑葉では、20,000 g 沈澱粒子の自家呼吸が大で、コハク酸添加の影響は少く、コハク酸酸化酵素系の細胞内所在を明らかにし得なかつた。しかし磨砕液の自家呼吸は、マロン酸で抑えられる。これらの諸性質に関し、健病間に本質的な差は認められなかつた。

(3). ダイコン根、チユウリツプ芽では、磨砕液の 10,000 g 沈澱粒子によつて、容易にコハク酸の酸化が認められ、その酸素吸収はマロン酸で抑えられる。即ち健病両組織とも、コハク酸酸化酵素系は、磨砕液の 10,000 g 沈澱粒子に存在する。

(4). 半葉接種後、培養液に浮遊して3日後のタバコ切取葉の酸素吸収量を、定量的に無接種半葉と比較した。disk (生葉) の酸素吸収量は健病間に差無く、磨砕液では、接種葉が無接種葉より大であつた。

引 用 文 献

1. AKAZAWA, T. and I. URITANI: J. Biochem. (Japan), 41: 631-638, 1954.
2. BAWDEN, F. C.: Plant viruses and virus diseases, Chronica Botanica, pp. 277-297, 1950.
3. BRUMMOND, D. O. and R. H. BURRIS: Proc. Nat. Acad. Sci., 39: 754-759, 1953.
4. BRUMMOND, D. O. and R. H. BURRIS: J. Biol. Chem., 209: 755-765, 1954.

5. 榎藤道夫: 鹿児島大学農学部学術報告, 3: 25-27, 1954.
6. 平山重勝: 日植病報, 14: 29-32, 1950.
7. LATIES, G. G.: Plant Physiol., 28: 557-575, 1953.
8. MILLER, A.: Arch. Biochem. and Biophys., 42: 149-163, 1953.
9. MILLER, A. and J. BONNER: J. Histochem. and Cytochem., 1: 254-264, 1953.
10. OHMURA, T.: Arch. Biochem. and Biophys., 57: 187, 1955.
11. TAKAHASHI, W. N.: Amer. Jour. Bot., 34: 496-500, 1947.
12. 山口 昭・平井篤造: ウイルス, 6: 1-7, 1956.

Résumé

Intracellular localization of succinic oxidase activity in the virus infected plant tissues was studied in employing the cell fractionation technic. The particulate fraction of the tobacco leaf homogenates prepared as indicated in Figure 1 had a high endogenous oxygen consumption. Although it showed only a slight increase by the addition of succinate, the inhibition of oxygen uptake by malonate was clearly demonstrated (Figs. 2,3). In these respects, no essential differences between the uninfected and TMV-infected tobacco leaves were observed.

In contrast, the particulate fraction of the homogenates of the virus infected radish root or tulip bud prepared following the procedure of Figure 4, had a low endogenous respiration (both the viruses have not yet been identified). Moreover, an enhanced uptake of oxygen was easily demonstrated by this particulate fraction when succinate was added. In the uninfected plant tissues, the same tendencies of succinate oxidation as in the infected ones were confirmed (Figs. 5,6).

The quantitative comparison of succinic oxidase activity between the virus-infected and uninfected tissues was thought to be unavailable in this sort of study, because both the tissues selected in this study differed in their growth stage. Thus, the qualitative nature of the various centrifugal fractions, for example, endogenous respiration or succinate oxidation, was shown in Table 1.

The quantitative determination of rate of respiration was then carried out using the carefully prepared tobacco leaf-halves which were inoculated with tobacco mosaic virus and floated on the nutrient solution. Oxygen consumption of the disks of inoculated leaf-halves was found not to show any detectable differences from that of the uninoculated disks. In the case of leaf homogenates, on the contrary, oxygen uptake of the inoculated leaf-halves tend to exceed comparatively that of the uninoculated ones (Figs. 7,8).

Laboratory of Phytopathology
Nagoya Univ., Anzō

濾紙電気泳動によるウイルス病の診断

平 井 篤 造*

Tokuzo HIRAI: The diagnosis of plant virus diseases by means of the paper electrophoresis.

濾紙電気泳動は最近蛋白質、アミノ酸、糖、色素、酵素をはじめとして、有機リン酸エステル、核酸構成塩基など種々の物質の分離定量に用いられている (1,2,3,8,10,12,17)。植物ウイルス病では GRAY (4) がはじめてこれを応用した。著者はウイルス病の診断に用いる目的で実験し、その一部は既に速報したが (6)、その後のデータをも加えて、ここに報告する。

起稿にあたり、実験の一部を担当された今泉照男・谷口武の二氏に感謝する。

実験方法

多くは葉を用いたが、時には塊茎など貯蔵器官も使用した。まず組織を湿重の4倍量の M/15 磷酸バッファ (pH 7.0) ですりつぶし、ガーゼで濾し、濾液を軽く遠沈 (3,000 rpm, 20分) して上澄をとる。これに 0.6 飽和になるよう硫酸を加え、生じた蛋白の沈澱を遠沈して集める。これを組織の $\frac{1}{6}$ 量の磷酸バッファにとかして供試材料とした。

泳動装置は東洋濾紙 C 号器とし、短冊形 (2×40cm) の No. 51 濾紙に、(-) 極に近く試料をマイクロピペットで 0.05~0.02 ml 線状に添加する。0.05 ml の場合は、試料多量のため、添加部を赤熱ニクロム線で乾かしながらつけた。又 0.02 ml では、濾紙にバッファを通してから添加して乾燥しない。バッファはベロナール (pH 8.6, イオン強度 0.045) とし、200~400 Volt, 0.3~0.6 mA/cm の間の定電圧定電流で通常 2~6 時間泳動した。電極は白金である。電流発生装置は東洋濾紙第 II 号型を用いた。その後濾紙を取り出し、110°C で乾燥し、brom phenol blue のアルコール溶液 (10% 飽和) で発色した。発色剤は種々検討したが (11,13)、上記が最も結果がよかった。これを稀醋酸水で分別し、乾燥後、小林式濾紙デンストメーター (Ⅲ型, 夏目製作所製) で、透明剤として流動パラフィンを用いて、泳動したスポットを定量した。なお、特殊の方法は各項において述べる。

実験結果

I. 各種ウイルス病での実験

まず診断を目的として、各種ウイルス病で健病両植物

間の比較を行つた。第1図は大豆モザイク病葉蛋白の健全葉蛋白との比較で、原点 (0) に見える強い吸着は、後述するように多くは葉緑粒蛋白である。細胞質蛋白は健病とも (+) 極に移行するが、病蛋白は健蛋白に比して易動度が劣っている。

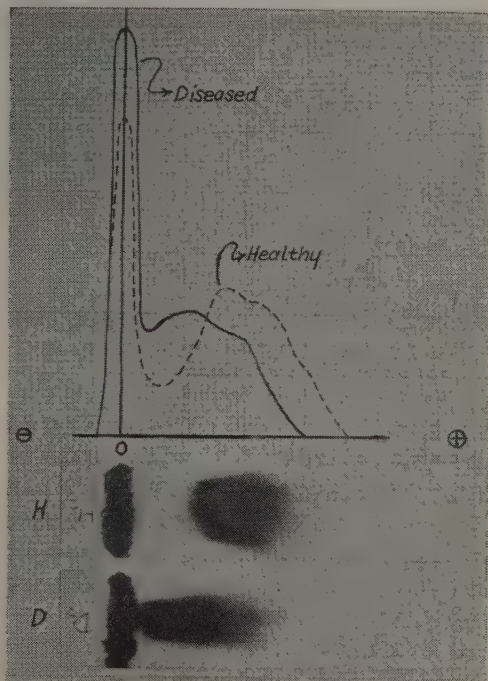


Fig. 1. Paper electrophoresis of the healthy and mosaic leaves of soybeans.

Protein fraction was precipitated by adding $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to leaf homogenates to 0.6 saturation. Electrophoresis was run at pH 8.6 in veronal buffer (300 V, 0.6 mA/cm, 3 hrs.). (+) anode, (-) cathode, O: origin, to which the test solution was applied, H: healthy, D: diseased. Optical density curves showing the protein fraction were obtained using a densitometer.

第2図はダイコンモザイク病葉の泳動図であるが、第1図とは同じ結果である。

* 名古屋大学農学部植物病理学教室。昭和31年(1956)7月20日受領
Forsch. Gebiet Pflanzenkrankh., Kyoto, 6(2): 87-96, 1956.

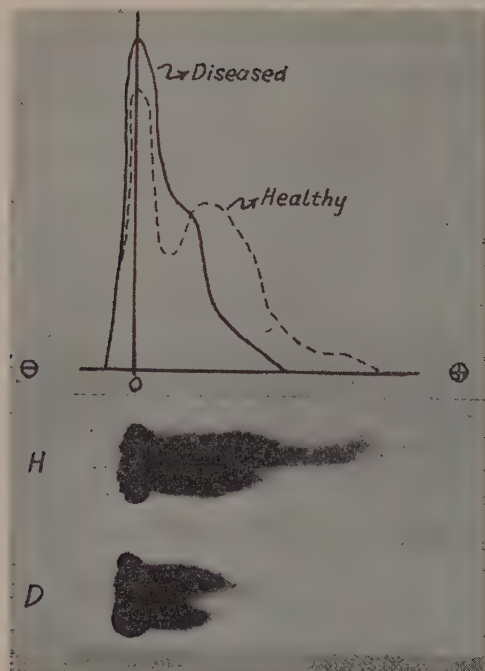


Fig. 2. Paper electrophoresis of the healthy and mosaic leaves of radishes.
Refer to the note in Figure 1.

第3図はジャガイモ（男爵）の連葉モザイク病葉（Yウイルスによる）の結果である。この場合は罹病細胞質蛋白が健全葉蛋白より多く移動し、前2者と反対の結果である。しかしよく見ると、病葉の方が原点を除いて3ヶのピークが見られるのに対して（矢印）、健全蛋白では1ヶである。即ち細胞質蛋白は病気の方が複雑な組成を有することがわかる。

第4図はジャガイモ（男爵）の天狗巣病葉の泳動図である*。この場合も病葉の方が僅に易動度が大であるが、健全蛋白に比してやはり複雑な組成を有し、細胞質蛋白でピークは病気が4~5ヶ（図は縮小されているのではつきりしない）、健全は1ヶである。なお、葉の核酸を SCHNEIDER 法で分割し、spectrophotometer を用いて、最高吸収 260 m μ で定量した結果は第1表である(5)。

Table 1. Nucleic acid content of the healthy and witches' broom virus-infected potato leaves.

	Percentage of the optical density at 260m μ	
	per wet weight	per dry weight
Healthy	100%	100%
Infected	76	97

* 天狗巣病試料を恵与された胆振馬鈴薯原種農場塩田技官に感謝する。

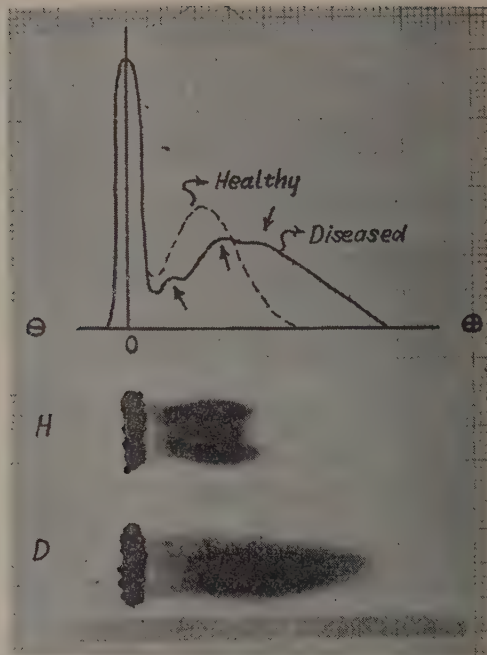


Fig. 3. Paper electrophoresis of the healthy and Y virus-infected potato leaves.
Refer to the note in Fig. 1. Arrows show the probable peaks in the optical density curves.

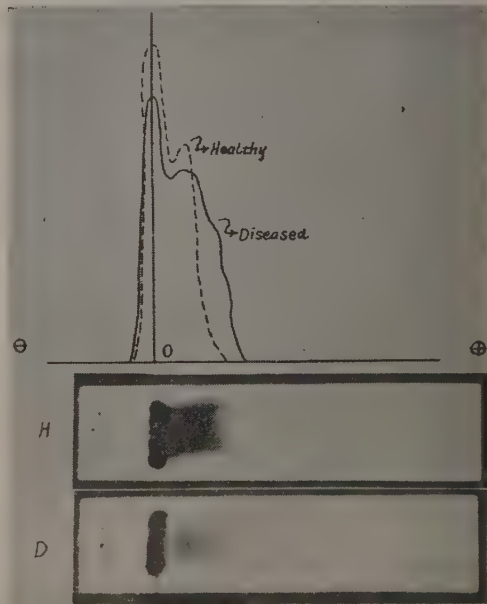


Fig. 4. Paper electrophoresis of the healthy and witches' broom virus-infected potato leaves (var. Danshaku).
Refer to the note in Figure 1.

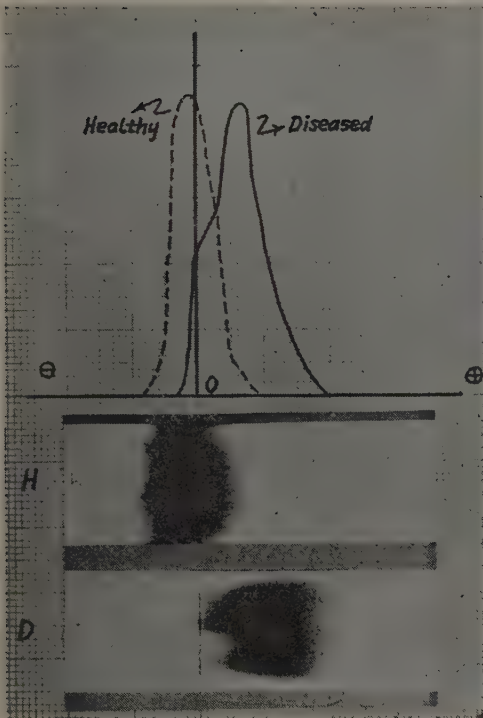


Fig. 5. Paper electrophoresis of healthy and witches' broom virus-infected potato tubers (var. May Queen).

Refer to the note in Fig. 1.

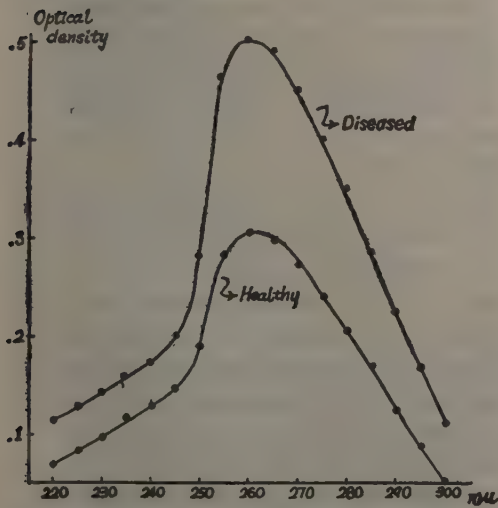


Fig. 6. Absorption spectra in the ultraviolet of nucleic acids of the healthy and witches' broom virus-infected potato tubers (var. May Queen).

第5図は同じ天狗巣病(品種メークイン)の病薯の蛋白を泳動した結果である。図のように健全薯蛋白は(-)極に、病薯蛋白は(+)極に移動する。第6図は薯の核酸量を定量したものである。即ち最高吸収は260 mμ附近で、病薯の方が健全薯より核酸量が多い。

次に第7図はジャガイモ(農林2号)の病薯(Yウイルスによる)の泳動図である。この場合も病蛋白は原点以外に3のピークが見られるが、健蛋白では2である(矢印に注意)。

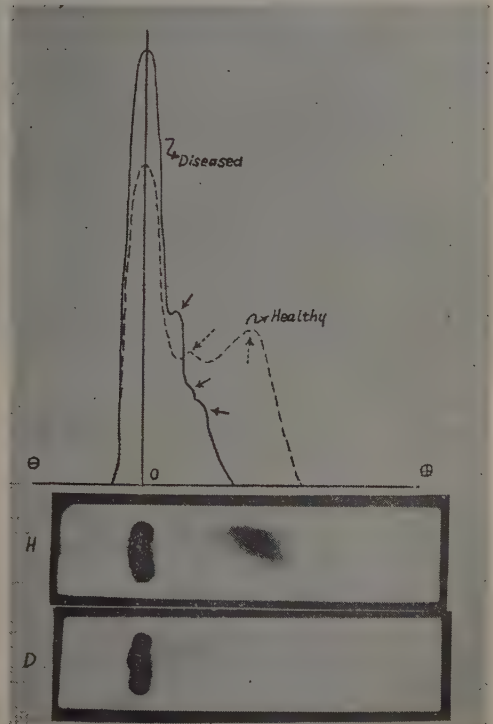


Fig. 7. Paper electrophoresis of the healthy and Y virus-infected potato tubers (var. Norin No. 2).

Refer to the note in Fig. 1. Arrows show the probable peaks in the optical density curves.

第8図はビール麦(品種はたかぜ)の壊疽性黄枯病(7)病葉の泳動結果である。図の如く健蛋白は(-)に、病蛋白は(+)に移動する。かつ病蛋白には少なくとも2ヶのピークが見られるが、健蛋白は1ヶである。

最後に茶樹のモザイク様病葉*の泳動結果を第9図に示す。即ちこの場合も病葉蛋白は健全のものより易動

* 試料を提供された東海近畿茶業部笠井技官に感謝する。

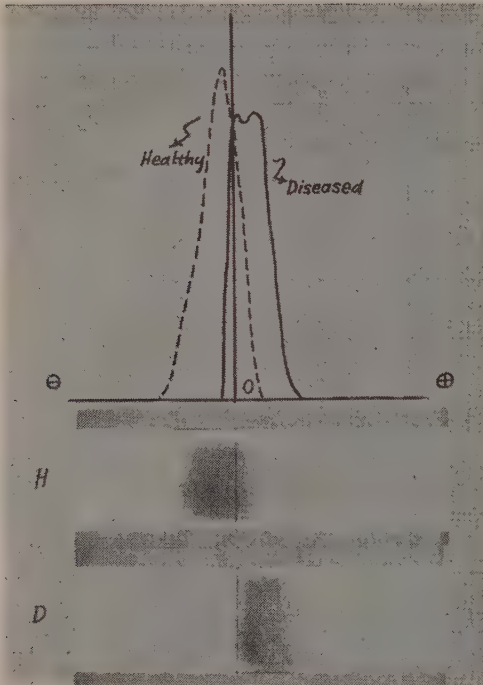


Fig. 8. Paper electrophoresis of the healthy and yellow-mosaic leaves of barley (var. Hatakeze). Refer to the note in Fig. 1.

度が劣る。

以上のように病蛋白は 1) 健蛋白に比して易動度が劣るか 2) 易動度が劣らない場合でも、複雑な組成を有するか、又は 3) 健蛋白が (-) 極に移動する場合でも (+) 極に移動する、など種々な相違がみられた。

II. タバコモザイクウイルス (TMV) に就いての諸検討

前節で得られた結果を、TMV を例にとつて多少解析してみることにした。

(1). 葉緑粒と非葉緑粒の分割

まずホモジナイズした葉汁液を、14,000 rpm で葉緑分割を洗滌させて分ち、その上澄に 0.6 飽和になるよう硫酸を加え沈澱をとり、これを非葉緑粒蛋白 (細胞質蛋白) とした。材料は健全タバコと TMV 罹病タバコである。各分割を電泳にかけると、葉緑分割は健病とも全然原点を動かない。非葉緑分割は第 10 図のとおりで、病蛋白は健蛋白に比して易動度が劣る。この場合原点に強い吸着があるのは、添加試料を乾燥したためである。

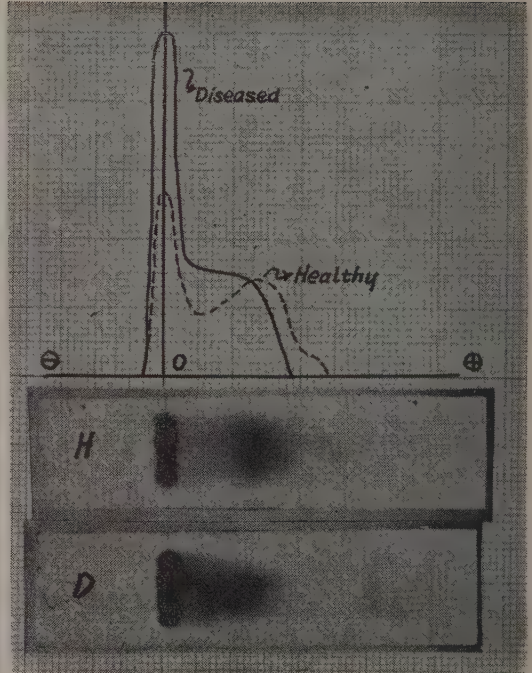


Fig. 9. Paper electrophoresis of the healthy and mosaic leaves of tea trees. Refer to the note in Fig. 1.

(2). 各飽和度の硫酸による沈澱

14,000 rpm 遠沈上澄をそのまま、或は 0.2, 0.4, 0.6 各飽和度になるよう硫酸を加え、その沈澱をとりそれぞれ電泳にかけた。第 11 図は遠沈上澄部をそのままの結果で、やはり病蛋白の方が易動度が少い。0.2, 0.4 各飽和度の硫酸沈澱部も大体同じ結果を得たが、0.6 飽和の場合が最も成績がよかった (第 12 図)。

(3). クロロフォルム・エマルジョン法によるウイルスを用いての検討

健病各葉汁液を磷酸バッファでホモジナイズし、低速遠沈してその上澄を電泳にかける。一方上澄 2 ml にクロロフォルム 2 ml, N アミルアルコール 1 ml を加え、強く振とう後、低速遠沈 (3,000 rpm, 15 分) すると、液は 3 層に分かれる。その最上層は水層で淡褐色であるが、TMV はこの層にうつると言われる (14)。試みにこの層を spectrophotometer にかけて、265 mμ に値かではあるが、最高吸収が見られる。この層をそのまま電泳にかけた。結果は第 13 図である。即ちクロロフォルムエマルジョン水層部は、健葉にはほとんど吸着部は存在しない。病葉に見られるものは TMV と考え

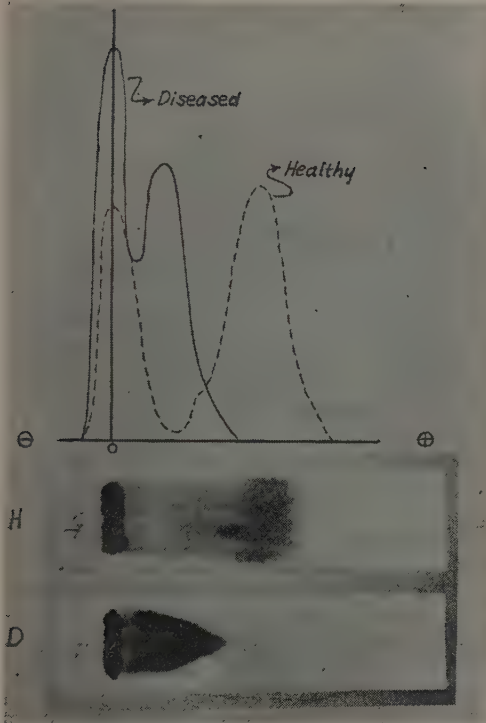


Fig. 10. Paper electrophoresis of the non-plastid fractions of the healthy and TMV-infected tobacco leaves.

Plastid fraction was removed by centrifuging the homogenized juices at 14,000 rpm., and to the supernatant $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was added to 0.6 saturation applying the resultant precipitates as the non-plastid fraction.

られる。これに対して低速遠沈上澄部は、図のとおり病葉蛋白が健全蛋白より易動度が少い。この原因は恐らく健全蛋白と TMV (図の chloroform fr.) が aggregate して、病蛋白の位置に定着したものであろう。

(4). 汁液の凍結溶解の影響

ホモジナイズ汁液の遠沈上澄を試験するとともに、液を一旦凍結させ、次で溶解を待つて遠沈した上澄を比較した。後者では葉緑粒が変性して、いちぢるしく除き易くなる。第 14 図はその電泳図であり、又第 15 図はそれをデンストメーターにとつた図である。即ち健全葉蛋白には 3 ヶのピーク (図中の 1, 2, 4) が見られるが、罹病葉蛋白には 4 ヶのピーク (1, 2, 3, 4) が見られる。第 3 のピークは健全葉に見られないものである。

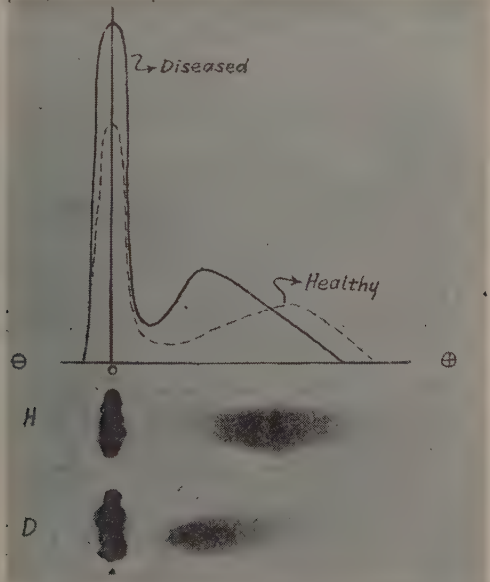


Fig. 11. Paper electrophoresis of the healthy and TMV-infected tobacco leaves. The supernatant solution obtained by centrifuging the homogenized juices at 14,000 rpm. was applied.

Refer to the note in Figure 1.

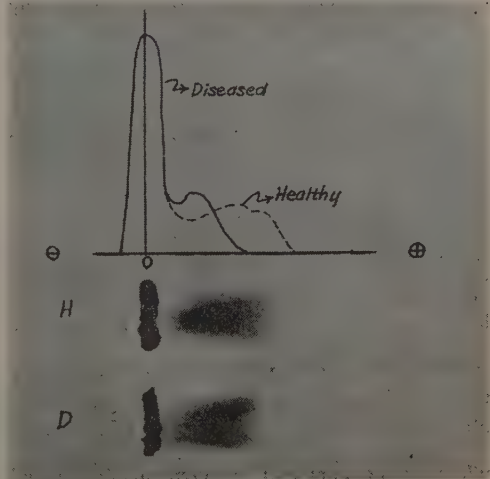


Fig. 12. Paper electrophoresis of the healthy and TMV-infected tobacco leaves.

The precipitates obtained by adding $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to leaf homogenates to 0.6 saturation was applied dissolving them in phosphate buffer.

Refer to the note in Figure 1,

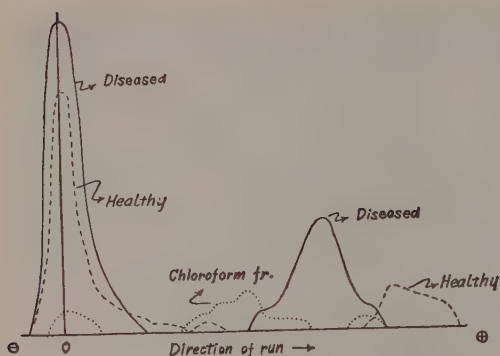


Fig. 13. Optical density curves showing the protein fractions in the healthy and TMV-infected tobacco leaves.

TMV was obtained by the chloroform emulsion method of SCHNEIDER (Chloroform fr.). (+) anode, (-) cathode, O: point of application.

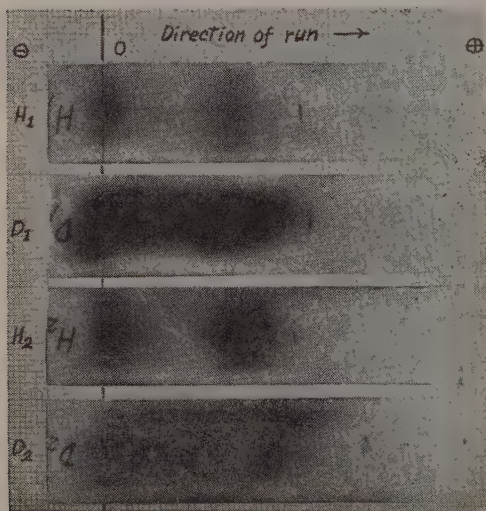


Fig. 14. Paper electrophoresis of the healthy and TMV-infected tobacco leaves.

H₁, D₁: The supernatant solution of the healthy and infected, respectively, obtained by centrifuging the homogenized juice at 14,000 rpm. H₂, D₂: Ditto., obtained by centrifuging the frozen and thawed juice. O: point of application, (+) anode, (-) cathode

(5). 硫安塩析・等電点沈澱法による半精製ウイルスを用いての検討

前記の凍結溶解後遠沈上澄部を用いるとともに硫安塩

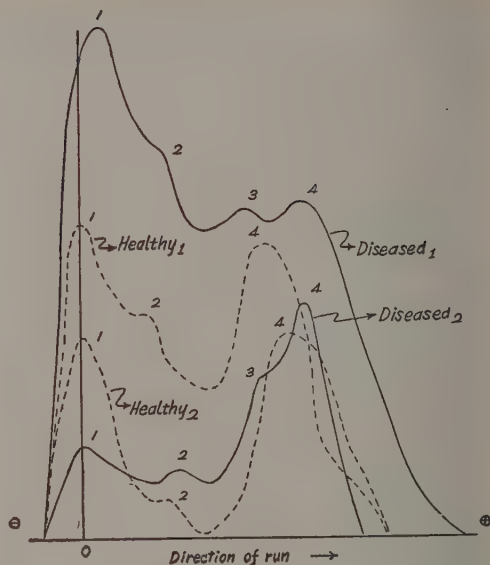


Fig. 15. Optical density curves of the electrophoretic run shown in Figure 14.

Healthy 1, 2, Diseased 1, 2 correspond to H₁, H₂ D₁ D₂ in figure 14, respectively. 1 2 3 4 show the peaks in the curves.

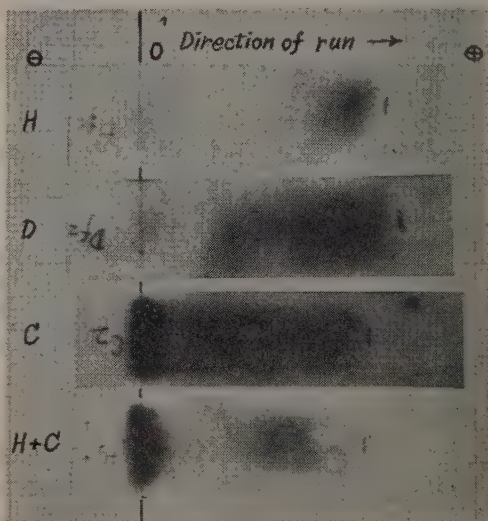


Fig. 16. Paper electrophoresis of the healthy and TMV-infected tobacco leaves.

H, D: The supernatant solution of the healthy and TMV-infected, respectively, obtained by centrifuging the frozen and thawed juice. C: Partially purified TMV by the method of ammonium sulphate precipitation. H+C: TMV added to the healthy juice.

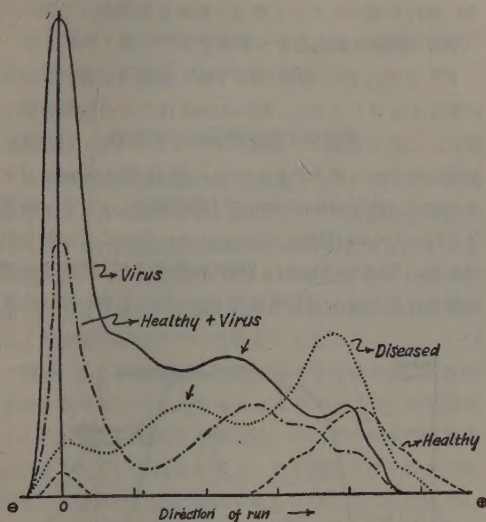


Fig. 17. Optical density curves of the electrophoretic run shown in Figure 16.

Virus means the partially purified TMV by ammonium sulphate precipitation method. Arrows show the probable peaks caused by TMV fraction.

析・等電点沈澱法によつて、半精製した TMV (16) を用いて試験した。その結果は第 16~17 図である。即ち TMV は原点に強い吸着を持つとともに、(+) 極の方向で一つのピークがある。この場合は添加試料を乾燥していないので、罹病葉蛋白で明にウイルス分劃 (第17図矢印) と健全蛋白分劃とが出現している。なお、健全蛋白に TMV を加えて展開したものは、両者が aggregate した形跡が認められた。

以上の結果から

- 1). 多くの場合添加試料の乾燥によつて生ずる、病葉蛋白が健全葉蛋白に比して易動度の少いことは、前者では健全蛋白とウイルスとが aggregate したものであること。
- 2). TMV は原点とそれに連つて、或はやゝ離れて (+) 極部に特異な吸着を持ち、罹病葉汁液の凍結溶解後遠沈上澄液の展開によつて、それに相当するピークを得ること。
- 3). TMV は (-) 極に移行することのないこと。などを確め得た。

III. P^{32} による radioautography と濾紙電気泳動

(1). クロロフォルムエマルジョン法による水層部の電泳とオートグラフ

P^{32} を含有する液に TMV を接種したタバコの切取葉

を浸漬し、4日後取り出し [4日目には既にウイルスが形成されている (16)], 前述のクロロフォルムエマルジョン法によりその水層をとり、これを TMV の等電点である pH 3.3 とし、生ずる沈澱を遠沈して集めた。これを少量の磷酸バッファにかき混ぜて泳動した。その結果をデンストメーターにかけたのが第 18 図である。即ち病蛋白は原点に大きな吸着を持ち、それに引きついて泳動する。

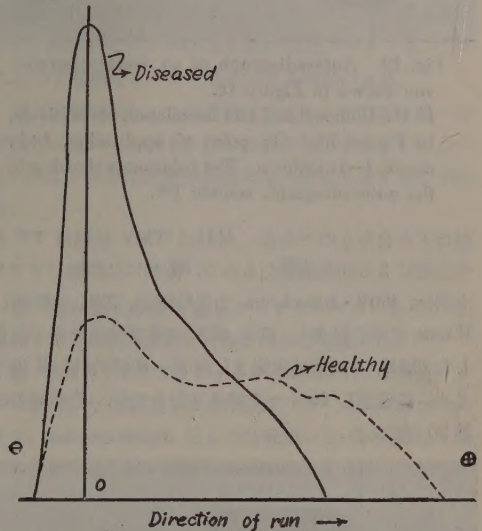


Fig. 18. Optical density curves of the electrophoretic run, to which applied the buffer phases of chloroform emulsion of the healthy and TMV-infected tobacco leaves.

Healthy: uninoculated, Diseased: TMV-inoculated. Both leaves were floated in water containing P^{32} .

これに対して健全蛋白は、原点から相当離れた処まで、平均して僅かの吸着があるに過ぎない。次にこれを X 線フィルムに 5 日間密着して autoradiograph にとつた (第19図)。図によると、罹病の方には原点附近に大きなスポットが見られる。第 2, 第 3 のスポットは電泳では現われなかつたもので、磷酸エステルと考えられる。罹病葉の原点附近のスポットは P^{32} が核酸に組み入り (16), 蛋白と結合した核蛋白、即ちウイルス自身であろう。健全葉ではほとんど原点附近の吸着が見られない。

(2). 磷酸エステルの電泳とオートグラフ

LePAGE and UMBREIT の方法によつて、葉汁液を Ba 不溶分劃と Ba 溶性・アルコール不溶分劃とに別けた (16)。前者は ATP・ADP などとともに無機 P を含み、後者はブドウ糖 1 磷酸、ブドウ糖 6 磷酸、リボース 5 磷酸

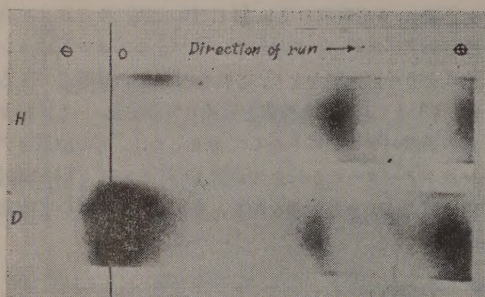


Fig. 19. Autoradiograph of an electrophoretic run shown in Figure 18.

H, D: Uninoculated and inoculated, respectively, in Figure 18. O: point of application, (+): anode, (-): cathode. The substances showing in the autoradiograph contain P^{32} .

酸などを含むものである。材料は TMV 接種後 P^{32} を含む液に 3 日間浸漬したもので、泳動には醋酸パツファを用い、 $400V \cdot 0.6mA/cm$ で 3 時間後、 $70^{\circ}C$ で乾燥し、HANES 試薬に浸漬し、更に $85^{\circ}C$ で乾燥後紫外線で呈色した(3,12)。又展開を完了した同一濾紙試料を X 線フィルムに密着して、オートグラフをとった。その結果は第 20 図である。

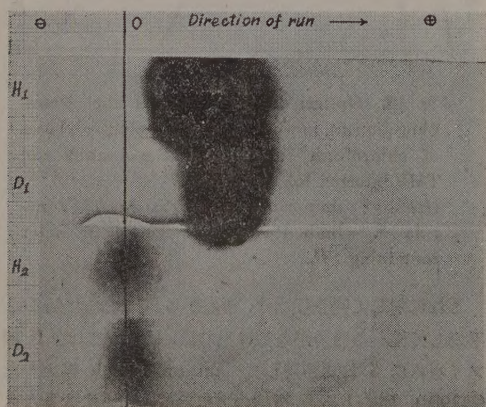


Fig. 20. Autoradiograph of an electrophoretic run of tobacco leaf phosphoric ester fraction prepared by a LePAGE and UMBRETT method. H₁, D₁: Ba-insoluble fraction of the uninoculated and TMV-inoculated leaves, respectively. H₂, D₂: Ba-soluble alcohol-insoluble fraction of the uninoculated and TMV-inoculated leaves, respectively. The substances showing in the autoradiograph contain P^{32} .

即ち Ba 不溶分劃のスポットは大きく、この大部分は無機 P であろう。Ba 溶性分劃のスポットは小さかつたが、以上両者いづれも健病間に明らかな差がなく、又

Ba 溶性分劃はほとんど原点を動かかなかつた。

(3). 核酸の電泳とオートグラフ

P^{32} を含む液に浸漬した TMV 接種 4 日目のタバコの葉をホモジナイズし、SCHNEIDER 法でその核酸分劃を得た。これを濃縮して電泳にかけるとともに、展開濾紙を用いてオートグラフをとった。第 21 図は borate バツファ中で、 $500V \cdot 0.6mA/cm$ で 3 時間泳動し、プリンの発色を行つたもの (15) を、デンストメーターにとつたものである。即ちいづれも (+) 極に移動するが、罹病葉核酸は健全に比して、易動度は劣る。ただしピークは大きい。

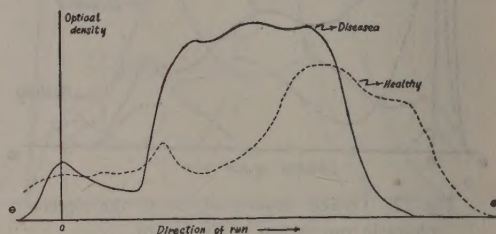


Fig. 21. Optical density curves of an electrophoretic run, to which applied the nucleic acid fraction of tobacco leaf prepared by a SCHNEIDER method.

Healthy: uninoculated, Diseased: TMV-inoculated, Both leaves were placed in water containing P^{32} .

オートグラフの結果は第 22 図に示す。図によると、健全葉では原点に葉緑粒に由来すると考えられるもの、それからやや移動したものがある。罹病葉では原点附近に強い吸着がある。これは P^{32} の incorporate したウイルス核酸であろう。

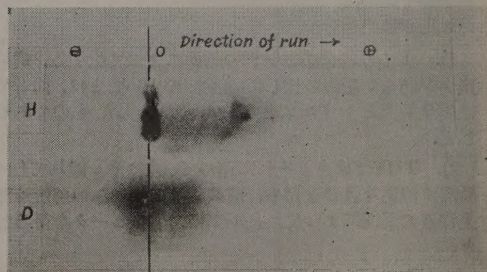


Fig. 22. Autoradiograph of an electrophoretic run shown in Figure 21.

H, D: uninoculated and TMV-inoculated, respectively, shown in Figure 21. The substances showing in the autoradiograph contain P^{32} .

以上の実験から

- 1). TMV は原点附近及びそれから (+) 極にやや移動

した部分に泳動すること。

2). 罹病・健全両葉の磷酸エステルは、電気泳動的に差の認められぬこと、などを確め得た。

診断法への応用に就ての考察

ウイルス病の診断法には従来種々述べられているが、著者はウイルス自身を見、或はウイルス核蛋白を定性又は定量する、所謂直接的診断法が有効と考えている。この線に沿つて、組織内のウイルス染色法(9)、核酸定量法(5)などをさきに提案したが、ここに濾紙電気泳動法による診断の可能について考えてみたい。

TMVのような既知の性質を有するものでは、それ特有の泳動のピークを出させることができるが、未知のウイルス的病害に適用する場合は、そのウイルスの性質もはつきりしていないとすると、まず蛋白フラクションに何等か異常がないかを検討することからはじめねばならぬ。その為に第一に厳密な対照(健全)植物を選ぶことが先決である。対照なしで病植物だけで診断することは、今の処むづかしい。両者をならべて泳動した場合 1). (+)(-)のどちらの極に移動するか 2). 泳動の速度 3). 泳動の各分割のピークなどを注意する必要がある。

ただし泳動の速度は泳動の条件、又同一条件でも、ならべてかける濾紙の位置などによつても異なる場合がある。著者がこの実験の一部で行つた、試料を乾燥させながら 0.05 ml というやゝ多量をつける方法は、蛋白の変性などを起し易く、あまり感心できない。やはり濾紙にまずバッファを通して、少量(0.02 ml 程度)添加する方が、泳動のピークもはつきりする。

泳動試料の蛋白を得る方法として、ここでは硫酸沈澱法を用いたが、必ずしもこれによる必要はない、汁液を濃縮するためには、凍結乾燥を行うのもよい(4,18)。又供試液をあらかじめ透析して、低分子物質を除くことも必要となるであろう。

泳動条件に就ても更に検討する必要がある。できればもつと弱い電圧及び電流で、長時間(10~20時間)泳動するのも一つの方法であろう。又バッファも植物試料に適用する場合として考える必要がある。YASUDA ら(18)はジャガイモ塊茎で、ジャガイモ蛋白の等電点より少し上の pH 5.93 の cacodylic バッファを用いてよい結果を得て、いもの蛋白に 6 ヶの泳動ピークが存在することを認めている。

以上のようにして、健病間に電気泳動的に何等かの差違があつたとすると、一応供試材料に異常蛋白が存在したと考えてよい。しかしこれら泳動性質の差は、必ずし

もウイルス蛋白のみに限らず、他の異常蛋白によつても起り得る可能性がある。もつともこれはウイルスと異常蛋白との関係、或はウイルスの定義如何の問題にも関連するので、本報では深く追究しない。

この方法とチズリウス泳動装置との優劣であるが、濾紙電泳は 1). 試料が極く少量で済むこと 2). 設備が安価 3). 方法が簡便 4). うまくやればチズリウス法とほぼ同結果を得ること などから、必ずしもチズリウスに劣るものではない。又デンストメーターは是非必要であり、肉眼ではピークの見えない呈色スポットも、これによつて微細なピークを発見できる利点がある。

以上の結果から、この方法はウイルス病診断の唯一の方法ではないとしても、他の方法と併用することによつて、かなり有力な診断的武器となり得ると信ずるのである。

摘 要

1). 濾紙電気泳動と濾紙デンストメーターを用いて、植物ウイルス病の診断の可能について実験した。

2). TMV (タバコモザイクウイルス) は、半精製ウイルスを用いた実験並びに接種葉に P³² を incorporate させ、radioautograph をとつた実験から、原点附近とそれから (+) 極にやゝ移動した処にピークを持つことを明にした。

3). 他の未知のウイルス病又は類似病害に適用する場合は、健全対照植物を用いて、1) 易動度の大小 2) 移動する極 3) 泳動のピークなどを精査することによつて、ある程度診断的役割を果し得ることを述べた。

引 用 文 献

- 1) BARNETT, A. J. G. and D. K. SMITH: Nature, 74: 659-660, 1954.
- 2) EDSTRÖM, J. E. and H. HYDEN: Nature, 174: 128-129, 1954.
- 3) EGGLESTON, L. V. and R. HEMS: Biochem. J., 52: 156-160, 1952.
- 4) GRAY, R. A.: Arch. Biochem. and Biophys., 38: 305-316, 1952.
- 5) 平井篤造: 植物防疫, 9: 417-420, 1955.
- 6) ———: 日植病関西西部会講演, 1955.
- 7) 岩瀬茂基・都築仁: 愛知農試彙, 10: 15-21, 1955.
- 8) 近藤弘・鷺見美代子: 科学, 26: 307-308, 1956.
- 9) 越水幸男・平井篤造・小岩竜衛: 日植病報, 17: 102-108, 1953.
- 10) 森五郎・小林茂三郎: 濾紙電気泳動法の実際, pp. 178, 南江堂, 1955.
- 11) NEELY, R. A. and D. W. NEILL: Nature, 176: 33-34, 1955.

- 12) NEIL, M. W. and D. G. WALKER: Biochem. J., 56: XXVII, (No. 3) 1954.
- 13) RIDEOUT, L. A. and R. W. PRICHARD: Science, 121: 374, 1955.
- 14) SCHNEIDER, I. R.: Science, 117: 30-31, 1953.
- 15) SMITH, J. D.: The nucleic acids (CHARGAFF, E. and J. N. DAVIDSON, Eds.) Vol. I, p. 267, Academic Press, 1955.
- 16) 下村徹・平井篤造: 植物病害研究, 6: 73-79, 1956.
- 17) WETTER, L. R. and J. J. CORRIGAL: Nature, 174: 695, 1954.
- 18) YASUDA, G. K. et al.: Nature, 176: 1029-1030, 1955.

Résumé

GRAY has recently reported an electrophoretic technique for some of the plant viruses. In the present paper an attempt was made to apply the technique for the diagnosis of plant virus diseases.

Leaves (sometimes tubers) were homogenized with M/15 phosphate buffer (pH 7.0) and the juice was centrifuged. To its supernatant ammonium sulphate was added to 0.6 saturation and the resultant precipitates were used as a protein solution dissolving them in a phosphate buffer.

A Toyoroshi C type of instrument was used for producing zone electrophoresis, which was run for 2-6 hours using a veronal buffer (pH 8.6, ionic strength 0.045). A potential of 200-400 V (d.c.) was applied to give a current of 0.6 mA/cm breadth. The relative amounts of proteins in the leaf juices which were dyed in brom phenol blue-alcohol solution, were measured using a densitometer (No. III type, Natsume Instruments Ltd., Japan).

name them
Figs. 1-9 show a comparison of the electrophoretic run between the healthy and virus-infected plants and the following conclusions are presented.

- 1). Virus-infected proteins move less than healthy ones on a filter paper.
- 2). Frequently the latter proteins move toward cathode, although the former move toward anode.
- 3). Electrophoretic patterns of the former proteins differ from those of the latter.

To obtain an information concerning the nature of the data presented above, the proteins of TMV-infected tobacco leaves were investigated in a comparable detail (Figs. 10-17), the results of which are outlined as follows.

- 1). The healthy proteins and TMV of the infected leaves will be sometimes aggregated and move less than the healthy proteins of the uninfected leaves.
- 2). Partially purified TMV did not move from the point of application or when moved a pattern toward anode near the point was observed.
- 3). A peak in the optical density curves caused by TMV can be recognized among the electrophoretic patterns of the infected proteins.

In Figures 18-22 are presented the results of the electrophoretic run of virus, phosphoric ester, and nucleic acid fractions of the tobacco leaves which placed in water containing P^{32} and into which the P^{32} was incorporated. In addition, an experiment of radioautograph of the electrophoretic run was also included, the results of which have given a general support to the previous conclusions.

Laboratory of Phytopathology
Faculty of Agriculture
Nagoya University,
Anzō